

Design und Synthese heterocyclischer Liganden für die TAR-RNA aus HIV-1

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische
Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe Universität
in Frankfurt am Main

von

Oliver Boden

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main

2005

(DF1)

Erster Gutachter: Prof. Dr. M. W. Göbel

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. G. Quinkert

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

Datum der Disputation: 24.02.2006

Zusammenfassung

Design und Synthese heterocyclischer Liganden für die TAR-RNA aus HIV-1

Oliver Boden

In den letzten zwei Dekaden wurde die Rolle der RNA in biologischen Prozessen intensiv untersucht. Man erkannte immer deutlicher, dass ihre Funktion über die einfache Vermittlung von Information von der DNA hin zum Protein weit hinausgeht. So spielt sie eine entscheidende Rolle bei der Genexpression und besitzt darüber hinaus auch katalytische Eigenschaften. Die Entdeckung der reversen Transcriptase beim HI-Virus konnte zeigen, dass genetische Informationen nicht nur in Richtung von DNA zu RNA, sondern auch in Entgegengesetzter Richtung übertragen werden kann. Diese Schlüsselrolle in vielen wichtigen biochemischen Prozessen macht die RNA zu einem viel versprechenden Ziel für die Entwicklung neuer Wirkstoffe, um in diese Prozesse eingreifen zu können. RNA bildet eine Vielzahl von stabilen Sekundär- und Tertiärstrukturen aus, die es Proteinen und Antibiotika ermöglicht, sie zu adressieren. Die bis heute wohl mit Ausnahme des Ribosoms und der tRNAs am besten aufgeklärte Struktur einer RNA ist die der HIV TAR-RNA (*trans-aktivierende Region*). Ein essentieller Bestandteil für die virale Genexpression ist die so genannte TAR-RNA. Diese befindet sich am 5'-Ende aller viraler Transkripte und bildet eine aus 59 Basen bestehende stem-bulge-loop hairpin Struktur. Diese tritt in Wechselwirkung mit dem tat-Protein. Die Grundlage für die Erkennung des hierbei entstehenden Komplexes ist eine Wechselwirkung von tat mit der bulge- und loop-Region von TAR. Durch Interaktion mit der loop-Region kommt es zur Ausbildung eines CyclinT1/tat Komplexes, der im weiteren dafür verantwortlich ist, dass sich die Rate der Transkription um das mehrere hundertfache erhöht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Liganden zu synthetisieren, die spezifische Bindungen mit der TAR-RNA aus HIV-1 eingehen. Durch eine solche Bindung ist es möglich, den viralen Replikationszyklus zu unterbrechen. Ausgehend von einem relativ rudimentären Design, basierend auf dem Arginin-Fork-Model von Frankel, gelang es, mit Triaminopyrazol und verschiedenen seiner Derivate dieses Ziel zu erreichen. Nach erfolgreicher Synthese der Zielstrukturen wurden diese in einem FRET-Assay im Hinblick auf ihre Affinität zu der TAR-RNA getestet. 3,4,5-Triaminopyrazol übertraf trotz seiner geringen Größe und Ladung mit einem IC_{50} -Wert von 30 μM die Werte vieler tetrakationischer Tripeptide (FRET). Nach erfolgreicher Bestimmung der TAR-Affinität von Triaminopyrazol wurde seine Wirkung auf HIV-infizierte Hela P4-Zellen untersucht, die ein Tat-TAR-kontrolliertes Reportergen exprimierten. Dabei zeigte Triaminopyrazol eine Inhibierung mit $IC_{50} = 50 \mu M$. Bis zu einer Konzentration von 500 μM traten hierbei keine toxischen Effekte auf. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei Triaminopyrazol tatsächlich um einen tat-Antagonisten handelt. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von Triaminopyrazol nicht die eines Entryinhibitors ist, sondern dass die Verbindung in der Lage ist, die Zellmembran zu durchdringen.

Für Annette

„Das Buch enthält eine beträchtliche Fülle von Informationen.

Ich bedaure das zutiefst, aber es ging leider nicht anders“

(Mark Twain 1835-1910)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2001 bis März 2005 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. W. Göbel am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Herrn Prof. Dr. M. W. Göbel möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas, die ausgezeichneten experimentellen Bedingungen sowie die hervorragende fachliche Betreuung und die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen danken.

Bedanken möchte ich mich bei der DFG für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Sonderforschungsbereiches RNA-Ligand-Wechselwirkungen (SFB 579).

Herrn Dr. G. Dürner und seinen Mitarbeiterinnen G. Stracke, E. Müller und M. Funke möchte ich ganz besonders für die Analytik mittels HPLC danken.

Darüber hinaus danke ich Frau G. Stracke für die Bereitstellung von destillierten Lösungsmitteln und ihrem unermüdlichen Versuchen, mich zur Aufgabe des Rauchens zu bewegen.

Mein Dank gilt weiter dem Team um Herrn Dr. G. Zimmermann für die Bereitstellung der Infrastruktur zum Messen von NMR-Spektren.

Frau M. Christof danke ich für die Anfertigung von Elementaranalysen und die zahlreichen Zigarettenpausen, die sie mit mir verbrachte.

Frau I. Pries sowie Frau H. Brill möchte ich für die Messung von Massenspektren danken.

Der Arbeitsgruppe um Frau Dr. U. Dietrich danke ich für die Durchführung von Zellkultur-Untersuchungen.

Bei den Mitarbeitern im Arbeitskreis Kreuter möchte ich mich für die Möglichkeit zur Durchführung von Fluoreszenzmessungen und der angenehmen Laboratmosphäre bedanken.

Herrn Dipl.-Chem. P. Krattiger (Universität Basel) danke ich für die Zusammenarbeit bei der Synthese der Tag-Verbindungen.

Frau Dr. U. Scheffer, Frau E. Kalden und Frau N. Brüssler bin ich für die Bereitstellung von RNA-Proben sehr dankbar.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. H. Schwalbe und seinem Arbeitskreis für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen an Ligand-RNA Komplexen. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dipl. Chemiker J. Ferner und Herrn Dipl. Chemiker J. Graf für die Durchführung der Experimente bedanken. Herrn Dr. J. Hennig (Scripps Research Institut) danke ich für die Bereitstellung der HIV-2 TAR-RNA Probe.

Des weiteren gilt Herrn Prof. Dr. Schneider und seinen Mitarbeitern Herrn Dipl. Biol. S. Renner und Herrn Dipl.-Ing. Dipl.-Inf. A. Givechi mein Dank für die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Frau T. Ruppenthal danke ich für die Hilfe bei allen formalen Fragestellungen seitens des Sekretariats und ihr freundliches Wesen.

Für das kritische Durchlesen und die hilfreichen Anregungen zu der vorliegenden Arbeit bedanke ich mich bei Frau Dr. A. Boden und Frau Dr. V. Ludwig.

Für die außergewöhnlich gute Laboratmosphäre und die sehr gute Zusammenarbeit während der vorliegenden Arbeit möchte ich mich bei Herrn Dipl. Chem. D. Akalay, Frau Dipl. Chem. K. Beier, Herrn Dr. M. Hey, Herrn Dr. Z. Nazir, Herrn Dipl. Chem. S. Peter, Herrn Dipl. Chem. M. Suhartono, Herrn Dipl. Chem. C. Timm, Herrn Dipl. Chem. S. Ullrich, Herrn Dipl. Chem. H. Walther und Herrn Dipl. Chem. M. Weimar danken.

Insbesondere möchte ich mich bei „meinem Labor“ für die unvergessliche Zeit während dieser Zeit bedanken. Herr Dipl. Chem. G. Seifert und Frau Dr. V. Ludwig wurden viel mehr als nur Arbeitskollegen.

Frau Dr. V. Ludwig möchte ich darüber hinaus für ihre Freundschaft und den vielen Spaß im Labor und außerhalb der Universität danken.

Meiner Mutter danke ich für ihre jahrelange, nicht nur finanzielle Unterstützung während meines Studiums.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Frau Dr. A. Boden. Ohne ihre Liebe und ihren Rückhalt wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	8
2	HIV	12
2.1	BIOLOGISCHE GRUNDLAGEN DER HIV-INFEKTION	12
2.2	THERAPEUTISCHE ANSÄTZE	14
2.2.1	<i>Down-Regulation von CD4</i>	15
2.2.2	<i>Inhibitoren der Virusbindung (Entry-Inhibitoren)</i>	15
2.2.2.1	gp120/CD4 Inhibitoren	16
2.2.2.2	CXCR4 und CCR5 Antagonisten	17
2.2.2.3	Virus-Zell Fusion Inhibitoren.....	19
2.2.3	<i>Inhibitoren der Virusreplikation (Post-Entry-Inhibitoren)</i>	21
2.2.3.1	Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs)	21
2.2.3.2	Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors (NtRTIs)	22
2.2.3.3	Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs) ..	23
2.2.3.4	HIV-Integrase Inhibitoren	24
2.2.3.5	HIV-Protease Inhibitoren.....	26
3	RNA-LIGANDEN	28
3.1	STRUKTURMOTIVE VON RNA.....	29
3.2	ARTEN VON RNA-LIGAND WECHSELWIRKUNG	30
3.2.1	<i>Elektrostatische Wechselwirkungen</i>	32
3.2.2	<i>Wasserstoffbrückenvermittelte Wechselwirkungen</i>	32
3.2.3	<i>Wechselwirkungen durch Stapelung und Intercalation</i>	32
3.3	TAR-RNA AUS HIV-1	35
3.3.1	<i>Tat-TAR Wechselwirkungen</i>	36
3.4	BEISPIELE FÜR TAR-LIGANDEN	37
3.4.1	<i>Arginin und Argininamid</i>	37
3.4.2	<i>Aminoglycoside</i>	42
3.4.3	<i>Small Molecules</i>	44

3.4.4	<i>Peptidische Liganden</i>	47
4	EIGENE SYNTHETISCHE ARBEITEN	51
4.1	EIGENSCHAFTEN VON PYRAZOL	51
4.2	SYNTHESE VON PYRAZOL.....	53
4.3	SYNTHESE DER 3,5-DIAMINOPYRAZOLE.....	55
4.3.1	<i>Synthese von 4-alkylsubstituierten Diaminopyrazolen</i>	55
4.3.2	<i>Synthese von 4-unsubstituierten Diaminopyrazolen</i>	56
4.4	SYNTHESE VON TRIAMINOPYRAZOL	57
4.4.1	<i>Versuche zur Synthese über Aminomalonsäuredinitril</i>	57
4.4.2	<i>Synthese von Triaminopyrazol über Aminierung von Tribrompyrazol</i>	58
4.4.3	<i>Versuch der Synthese von Triaminopyrazol durch Reaktion von 3,5-Diamino-4-brompyrazol mit Ammoniak</i>	61
4.4.4	<i>Versuch der Synthese von Triaminopyrazol über die Synthese von 4-Brom-3,5-dinitro-1H-pyrazol 74</i>	62
4.4.5	<i>Synthese von Triaminopyrazolen über 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitropyrazol 77</i>	64
4.4.6	<i>Synthese von Triaminopyrazol 66 ausgehend von Pyrazol 53</i> ...	67
4.4.6.1	Untersuchungen des chemischen Verhaltens von Triaminopyrazol 66 bei der Verbrennungsanalyse	69
4.4.6.2	Untersuchungen des Oxidationsverhaltens von Triaminopyrazol.....	71
4.4.7	<i>Synthese von 1-Methyl-1H-pyrazolo[4,3-b]quinoxalin-3-amin 89</i>	72
4.4.8	<i>Versuche zur Synthese von 1-(3-Amino-1-methyl-1H-pyrazolo-[4,3-b]-quinoxalin-7-yl)-ethanon 91</i>	75
4.4.9	<i>Kupplung von 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitropyrazol mit Phenolen und Thiolen</i>	77
4.4.10	<i>Synthese von 1-H-3,5-Diamino-4-aminomethylpyrazol</i>	79
4.5	SYNTHESE VON ACETYLPROMAZIN UND DERIVATEN	82
4.6	VERSUCHE ZUR DARSTELLUNG VON NICHTNATÜRLICHEN AMINOSÄUREDERIVATEN	83

4.7	SYNTHESE VON BICYCLISCHEN DERIVATEN VON TRIAMINOPYRAZOL 66	86
5	KOMBINATORISCHE BIBLIOTHEKEN	87
5.1	KODIERTE KOMBINATORISCHE SYNTHESE	88
5.2	AUFBAU EINER KOMBINATORISCHEN TESTBIBLIOTHEK.....	90
5.2.1	<i>Vorversuche zur Schutzgruppenstabilität</i>	90
5.2.2	<i>Synthese einer kleinen Bibliothek</i>	92
6	IN VITRO ASSAY ZUR BESTIMMUNG VON BINDUNGS-AFFINITÄTEN 95	
6.1	THEORETISCHE GRUNDLAGEN DES FRET- EFFEKTS.....	95
6.2	FRET-ASSAY ZUR BESTIMMUNG DER BINDUNGS-AFFINITÄT	98
6.3	EXPERIMENTELLE BESTIMMUNG DER IC ₅₀ -WERTE IM FRET-ASSAY	100
6.4	ERGEBNISSE DER FRET-MESSUNGEN	102
6.5	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	107
7	ZELLKULTUREXPERIMENTE	110
7.1	AUFBAU DES ZELLKULTURASSAYS.....	110
7.2	ZELLKULTURUNTERSUCHUNGEN VON TRIAMINOPYRAZOL 66	111
7.3	ZELLKULTURUNTERSUCHUNGEN WEITERER VERBINDUNGEN	116
8	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	117
8.1	ZUSAMMENFASSUNG	117
8.2	AUSBLICK	120
9	EXPERIMENTELLER TEIL	121
9.1	ALLGEMEINE EXPERIMENTELLE BEDINGUNGEN.....	121
9.2	SYNTHESE VON 4-ALKYL-3,5-DIAMINOPYRAZOLEN.....	125
9.2.1	<i>Synthese von Allylmalonsäuredinitril 60a</i>	125
9.2.2	<i>Synthese von Methylmalonsäuredinitril 60b</i>	126
9.2.3	<i>Synthese von 4-Allyl-3,5-Diaminopyrazol 61a</i>	127
9.2.4	<i>Synthese von 4-Methyl-3,5-Diaminopyrazol 61b</i>	129
9.3	SYNTHESE VON 3,4,5-TRIAMINOPYRAZOL.....	131
9.3.1	<i>Synthese von 2-Aminomalonsäuredinitril 65</i>	131
9.3.2	<i>Synthese von Diethyliminomalonat 63</i>	132

9.3.3	Synthese von 3,5-Diaminopyrazol 64	133
9.3.4	Synthese von 4-Brom-3,5-diaminopyrazol 69	135
9.3.5	Synthese von 3,4,5-Tribrompyrazol 68	136
9.3.6	Synthese von 3,4,5 – Triaminopyrazol 66	137
9.3.7	Synthese von 4-Brompyrazol 70	139
9.3.8	Synthese von 1-Methylpyrazol 75	140
9.3.9	Synthese von 4-Brom-1-methylpyrazol 76	141
9.3.10	Synthese von 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitropyrazol 77	143
9.3.11	Synthese von 4-Benzylamino-1-methyl-3,5-dinitropyrazol 78 ...	145
9.3.12	Synthese von 3,4,5-Triamino-1-methylpyrazol als Salz der Schwefelsäure 79a	146
9.3.13	Synthese von 3,4,5-Triaminopyrazol 66 als Hydrochlorid	147
9.3.14	Synthese von 1-Nitropyrazol 81	149
9.3.15	Synthese von 1H-3(5)-Nitropyrazol 82	150
9.3.16	Synthese von 1,3-Dinitropyrazol 83	151
9.3.17	Synthese von 3,5-Dinitropyrazol 84	153
9.3.18	Synthese von 1,1,1-Trimethylhydraziniumiodid 117	154
9.3.19	Synthese von 4-Amino-3,5-dinitropyrazol 85	155
9.3.20	Synthese von 3,4,5-Triaminopyrazol 66	156
9.4	SYNTHESE VON DERIVATEN DES 3,4,5-TRIAMINOPYRAZOLS	158
9.4.1	Synthese von 1-Methyl-3,5-dinitro-4-phenylaminopyrazol 78b	158
9.4.2	Synthese von 3,5-Diamino-1-methyl-4-phenylaminopyrazol 79b	159
9.4.3	Synthese von 1-H-3,5-Diamino-4-phenylaminopyrazol 80a	160
9.4.4	Synthese von (2-Amino-ethyl)-carbaminsäure-tert-butylester 118	162
9.4.5	Synthese von [2-(1-Methyl-3,5-dinitro-4-ylaminopyrazol)-ethyl]- carbaminsäure-tert-butylester 78c	163
9.4.6	Synthese von [2-(3,5-diamino-1-methyl-4-ylaminopyrazol)- ethyl]-carbaminsäure-tert-butylester 79e	164

9.4.7	Synthese von N^4 -(2-Aminoethyl)-1-methyl-1H-pyrazol-3,4,5-triamin als Hydrochlorid 79c	166
9.4.8	Synthese von N^4 -(2-aminoethyl)-1H-pyrazole-3,4,5-triamin als Hydrochlorid 80b	167
9.4.9	Synthese von Bis-(2-Boc-aminoethyl)-(2-aminoethyl)-amin 119	168
9.4.10	Synthese von (2-{(2-tert-Butoxycarbonylamino-ethyl)-[2-(1methyl-3,5-dinitro-4-ylaminopyrazol)-ethyl]-amino}-ethyl)-carbaminsäure-tert-butylester 78d	170
9.4.11	Synthese von (2-{(2-tert-Butoxycarbonylamino-ethyl)-[2-(3,5-diamino-1methyl-4-ylaminopyrazol)-ethyl]-amino}-ethyl)-carbaminsäure-tert-butylester 79f	171
9.4.12	Synthese von N^4 -(2-[Bis-(2-amino-ethyl)-amino]-ethyl)-1-methyl-3,4,5-triaminopyrazol 79d	173
9.4.13	Synthese von N^4 -(2-[Bis-(2-amino-ethyl)-amino]-ethyl)-1H-3,4,5-triaminopyrazol 80c	174
9.4.14	Synthese von N-(1-Methyl-3,5-dinitro-4-yl)-benzen-1,2-diamin 78e	175
9.4.15	Synthese von 1-Methyl-1H-pyrazolo-[4,3-b]-quinoxalin-3-amin 89	177
9.4.16	Synthese von 3-Aminoimidazo-[4,5-c]pyrazol-5(2H,4H,6H)-on 112	178
9.4.17	Synthese von 3-Aminoimidazo-[4,5-c]-pyrazol-5(2H,4H,6H)-thion 113	179
9.4.18	Synthese von 4-Acetamidoacetophenon 93	181
9.4.19	Synthese von N-(4-Acetyl-2-nitrophenyl)-acetamid 94	182
9.4.20	Synthese von 4-Acetyl-2-nitroanilin 95	184
9.4.21	Synthese von 3,4-Diaminoacetophenon 96 als Hydrochlorid ...	185
9.4.22	Synthese von 4-Bromo-1-(methoxymethyl)-3,5-dinitro-1H-pyrazol 102	186
9.4.23	Synthese von 1H-3,5-diamino-4-aminomethylpyrazol 104	188

9.4.24	Synthese von 4-(4-Methoxyphenoxy)-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol 120	189
9.4.25	Synthese von 4-(4-methoxyphenylthio)-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol 121	190
9.5	SYNTHESE VON ACETYLPROMAZIN UND DERIVATEN	192
9.5.1	Synthese von Acetylpromazin 43	192
9.5.2	Synthese von 1-(10-(3-chloropropyl)-10H-phenothiazin-8-yl)ethanon 106	193
9.5.3	Synthese von {2-[{2-[3-(2-Acetyl-phenothiazin-10-yl)-propylamino]-ethyl}-(2-tert-butoxycarbonylamino-ethyl)-amino]-ethyl}-carbaminsäure-tert-butylester 107	196
9.5.4	Synthese von 1-[10-(3-{2-[Bis-(2-amino-ethyl)-amino]-ethylamino}-propyl)-10H-phenothiazin-2-yl]-ethanon 108	197
9.6	SYNTHESE DER TAG-VERBINDUNGEN FÜR KOMBINATORISCHE BIBLIOTHEKEN.....	199
9.6.1	Synthese des Tag-Alkohols 2,4,5-Cl ₃ C ₈ 124	199
9.6.2	Synthese des Tag-Alkohols 2,4,5-Cl ₃ C ₁₀ 125	200
9.6.3	Synthese des Tag-Alkohols 2,4,5-Cl ₃ C ₁₂ 126	201
9.6.4	Synthese der geschützten Tagverbindung Cl ₃ C ₈ 127	202
9.6.6	Synthese der geschützten Tagverbindung Cl ₃ C ₁₀ 128	203
9.6.7	Synthese der geschützten Tagverbindung Cl ₃ C ₁₂ 129	205
9.6.8	Synthese der Tagverbindung Cl ₃ C ₈ 130	206
9.6.9	Synthese der Tagverbindung Cl ₃ C ₁₀ 131	207
9.6.10	Synthese der Tagverbindung Cl ₃ C ₁₂ 132	208
9.7	OXIDATION VON TRIAMINOPYRAZOL ZU DEN OXIDATIONSPRODUKTEN 86 UND 87	210
10	ANHANG	211
10.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	211
10.2	KRISTALLSTRUKTUREN.....	213
10.2.1	Kristallstruktur von Triaminopyrazol 66	213
10.2.2	Kristallstruktur von Verbindung 89	218

10.3	SYNTHESE DER TRIPEPTIDSEQUENZEN.....	227
10.4	HERSTELLUNG DER TRIPEPTIDSEQUENZEN	228
10.4.1	<i>Acetylierung des polymeren Trägers</i>	<i>231</i>
10.4.2	<i>Abspaltung der Schutzgruppen</i>	<i>231</i>
10.4.3	<i>Inkubation der Tripeptide mit fluoreszenzmarkierter TAR-RNA</i>	<i>231</i>
10.5	FRET-MESSUNGEN	232
10.5.1	<i>Herstellung der HIV-1 wtTAR</i>	<i>232</i>
10.5.2	<i>Experimentelle Bedingungen</i>	<i>233</i>
10.5.3	<i>Graphische Darstellung der FRET-Messungen</i>	<i>234</i>
11	LITERATURVERZEICHNIS	245
12	PUBLIKATIONEN	253
13	LEBENS LAUF	254

1 Einleitung

In den letzten zwei Dekaden wurde die Rolle der RNA in biologischen Prozessen intensiv untersucht. Man erkannte immer deutlicher, dass ihre Funktion über die einfache Vermittlung von Information von der DNA hin zum Protein weit hinausgeht. So spielt sie eine entscheidende Rolle bei der Genexpression und besitzt darüber hinaus auch katalytische Eigenschaften. Die Entdeckung der reversen Transcriptase beim HI-Virus konnte zeigen, dass genetische Informationen nicht nur in Richtung von DNA zu RNA, sondern auch in entgegengesetzter Richtung übertragen werden kann. In neuerer Zeit konnte durch die Entdeckung von Riboswitchen gezeigt werden, dass eine bestimmte Klasse von mRNAs die Genexpression über die Bindung von kleinen Molekülen, wie z. B. Lysin oder Adenin, reguliert.¹

Diese Schlüsselrolle in vielen wichtigen biochemischen Prozessen macht die RNA zu einem vielversprechenden Ziel für die Entwicklung neuer Wirkstoffe, um in diese Prozesse eingreifen zu können. RNA bildet eine Vielzahl von stabilen Sekundär- und Tertiärstrukturen aus, die es Proteinen und Antibiotika ermöglicht, sie zu adressieren. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass RNA, im Gegensatz zu DNA, über keinerlei Reparaturmechanismen verfügt.

Schon 1944 wurde das Aminoglycosid Streptomycin, damals noch ohne Kenntnis von dessen Wechselwirkung mit den Ribosomen des Bakteriums, gegen Tuberkulose eingesetzt.² Aminoglycoside sind bis heute die wohl bekanntesten Vertreter von RNA bindende Molekülen. Die Störung der Translation am Ribosom durch Oxazolidone (z. B. Linezolid®) zeigt, dass auch bei anderen Verbindungsklassen das Potential für die Entwicklung weiterer Moleküle, die RNA adressieren, vorhanden ist.³

Für die Entwicklung von neuen synthetischen Molekülen, die als mögliche Medikamente eingesetzt werden sollen, werden meist Hochdurchsatz-Screening Methoden verwendet, die nur in begrenztem Ausmaß zu Erfolgen

geführt haben. Die ausgewählten Zielmoleküle sind zumeist Enzyme, deren katalytisches Zentrum blockiert werden soll. Da diese Zentren jedoch oft sehr ähnlich sind, wird eine genaue Adressierung sehr erschwert. Als alternativer Ansatz wird versucht, in der Reaktionskette einen Schritt zurückzugehen und die Bildung der zu beeinflussenden Proteine auf der Stufe der mRNA zu regulieren. Für das erfolgreiche Design solcher kleinen Moleküle ist die wohl wichtigste Voraussetzung, genaue Strukturdaten der Ziel-RNA zu besitzen.

Die bis heute wohl mit Ausnahme des Ribosoms und der tRNAs am besten aufgeklärte Struktur einer RNA ist die der HIV TAR-RNA (*trans-aktivierende Region*). Seit der ersten Diagnose von AIDS im Jahr 1981 starben bis heute mehr als 20 Millionen Menschen an dieser viralen Infektion. Die Zahl der Infizierten stieg 2003 auf 38 Millionen weltweit.⁴ Man versteht heute sehr detailliert die biochemischen Vorgänge bei der HIV-Infektion und –Replikation. Durch die Einführung von AZT® und anderen Medikamenten, die in Kombinationstherapien eingesetzt werden, ist es gelungen, den Ausbruch von AIDS um Jahre zu unterdrücken. Eine Heilung ist jedoch bislang nicht möglich.

Ein essentieller Bestandteil für die virale Genexpression ist die sogenannte TAR-RNA. Diese befindet sich am 5'-Ende aller viraler Transkripte und bildet eine aus 59 Basen bestehende stem-bulge-loop hairpin Struktur.⁵ Diese tritt in Wechselwirkung mit dem tat-Protein. Die Grundlage für die Erkennung des hierbei entstehenden Komplexes ist eine Wechselwirkung von tat mit der bulge- und loop-Region von TAR. Durch Interaktion mit der loop-Region kommt es zur Ausbildung eines CyclinT1/tat Komplex,⁶ der im weiteren dafür verantwortlich ist, dass sich die Rate der Transkription um das mehrere hundertfache erhöht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Liganden zu synthetisieren, die an die HIV TAR-RNA binden und so den Replikationszyklus unterbinden. Für das erfolgreiche Design solcher Liganden lassen sich aus der Betrachtung von bekannten DNA-Liganden einige empirische Regeln ableiten. So sollten geeignete Kandidaten in der Lage sein, elektrostatische Wechselwirkungen mit den Nukleinsäuren einzugehen, z.B. über Wasserstoffbrückenbindungen. Eine leichte Protonierbarkeit und die daraus resultierende positive Ladung ermöglicht

die Anziehung durch das negative Phosphordiesterückgrat. Ein weiterer wichtiger Faktor besteht in planaren Strukturen, die eine Interkalation zwischen den Basenpaaren der Nukleinsäure durch π - π -Wechselwirkungen ermöglichen.

Aus früheren Untersuchungen⁷ ist bekannt, dass nur ein Arginin ausreicht, um eine Konformationsänderung von TAR zu erreichen. Strittig war die Art der Wechselwirkung (siehe Abbildung 1). Erste Untersuchungen gingen davon aus, dass Arginin gleichzeitig zu Guanosin-26 und zwei benachbarten Phosphaten Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann.⁵ Später konnte gezeigt werden, dass dies nicht möglich ist, da der Abstand zu groß ist.⁸ Arginin ist entweder in der Lage, Wasserstoffbrücken zu dem Guanosin zu bilden (**A** in Abbildung 1) oder zu den beiden Phosphaten (**B** in Abbildung 1). Aus der Überlegung heraus, wie sich zwei Guanidiniumionen in den Positionen **A** und **B** zu einem einzigen Molekül verschmelzen ließen, wurden Derivate des 3,5-Diaminopyrazols **C** als potentielle TAR-Liganden in Betracht gezogen.

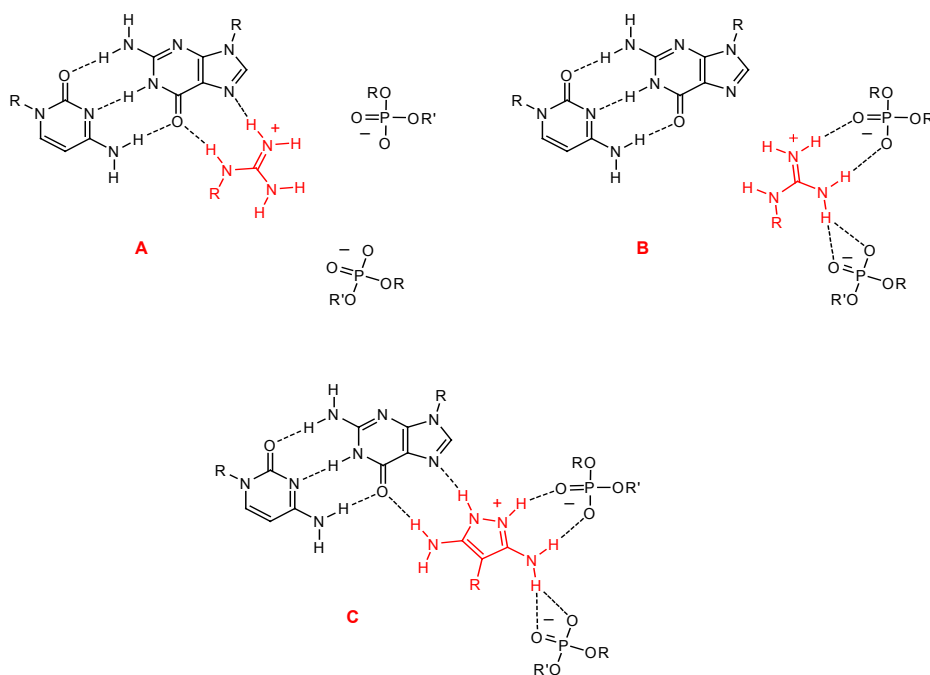


Abbildung 1.1: (A) Wechselwirkung von Arginin mit Guanosin-26; (B) Wechselwirkung von Arginin mit den dem Guanosin benachbarten Phosphaten; (C) Mögliche Wechselwirkungen von 3,5-Diaminopyrazol mit Guanosin-26 und den beiden Phosphaten

Durch diese Bindungshypothese sollten sich alle empirischen Regel für einen guten Liganden in einem Molekül vereinigen lassen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden entsprechende Liganden synthetisiert und auf ihre Wirkung getestet.

2 HIV

Nachdem 1983, zwei Jahre nach den ersten bekannt gewordenen Fällen, Luc Montagnier und Robert Gallo unabhängig voneinander die Ursache für die Entstehung von AIDS entdeckten, wurden enorme Anstrengungen unternommen, um die biologischen Grundlagen des Replikationszyklus von HIV zu untersuchen. Heute, nach mehr als 20 Jahren, ist dieser fast vollständig aufgeklärt.

2.1 Biologische Grundlagen der HIV-Infektion

HIV ist ein Retrovirus, der mit dem *human T-cell lymphotropic virus I* (HTLV-1), einem Auslöser für eine seltene Leukämieform, verwandt ist. Seine Wirtszellen sind die T4-Lymphocyten, die eine wichtige Rolle bei der Immunantwort spielen. Das HI-Viron besitzt einen Durchmesser von etwa 100 nm und wird von einer Lipiddoppelschichtmembran umhüllt. Diese enthält zwei Glycoproteine, gp41 und gp120. Gp41 durchdringt die Membran und ist über Disulfidbrücken mit gp120 verknüpft, das auf der äußeren Oberfläche lokalisiert ist. Im Inneren des Virus befinden sich zwei Kopien der viralen RNA sowie mehrere Moleküle der reversen Transcriptase. HIV infiziert seine Wirtszelle durch die Wechselwirkung von gp120 mit dem Plasmamembranrezeptor CD4. Durch die Fusion beider Membranen wird das Virusgenom direkt in das Cytosol entlassen. Dort wird durch die reverse Transcriptase die einzelsträngige Virus-RNA in die korrespondierende doppelsträngige DNA umgeschrieben. Die nachfolgende Abbildung zeigt schematisch die weiteren Schritte des Replikationszyklus.

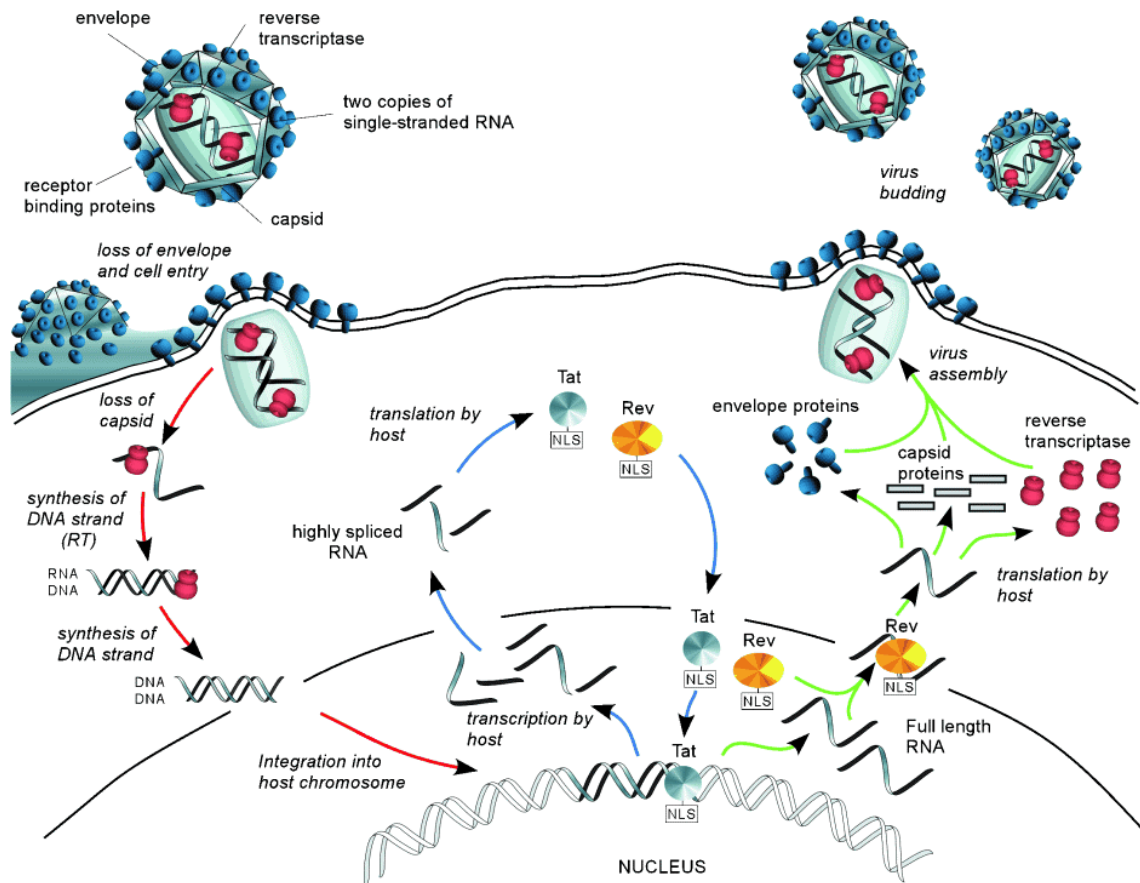


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der HIV-Replikation⁹

Nach erfolgter Synthese der DNA wird diese in das Genom der Wirtszelle mit Hilfe des Enzyms Integrase eingebaut. Dadurch wird die Zelle gezwungen, neues Virusmaterial zu produzieren. In diesem frühen Stadium ist die Replikation noch äußerst ineffektiv und es werden nur relativ kurze Transkripte produziert. Längere Transkripte werden sehr schnell gespliced. Die kürzeren RNA-Stücke gelangen aus dem Zellkern in das Cytosol und sind dort verantwortlich für die Expression von einer Vielzahl von viralen, regulatorischen Proteinen, unter anderem tat und rev. Tat translokiert in den Zellkern zurück und bindet dort an die TAR-RNA, die am 5'-Ende des viralen Transcripts lokalisiert ist. Dadurch wird die Transkription von Vollängen-RNA drastisch erhöht. Die späte Phase der Replikation ist gekennzeichnet durch die Bindung des rev-Proteins an die RRE-RNA.¹⁰ Durch diese Protein-RNA-Wechselwirkung gelangt nun die HIV-RNA aus dem Zellkern und wird gleichzeitig vor dem

splicen im Cytosol geschützt.¹¹ Durch die Präsenz von viraler RNA im Cytosol wird die Biosynthese von HIV-Proteinen ermöglicht, welche die Hüllen neuer Viruspartikel bilden.

2.2 Therapeutische Ansätze

In den letzten 15 Jahren wurden in der Behandlung von HIV-Erkrankungen große Fortschritte erzielt. Durch die Entwicklung zahlreicher Medikamente, die verschiedene Schlüsselschritte der HIV-Replikation blockieren, wurde es ermöglicht, den Ausbruch von AIDS um viele Jahre hinauszuzögern. In den folgenden Kapiteln werden die verschiedenen Therapieansätze vorgestellt. Die bisherigen, klassischen Zielmoleküle der Medikamentenentwicklung gegen HIV fasst die nachfolgende Tabelle zusammen.

Tabelle 2.1: Zielmoleküle für HIV-Behandlungen und ihre Rolle bei der Virus-Replikation

Zielmolekül	Rolle bei der Replikation
CD4-Rezeptor	viraler Eintritt
gp120-Glycoprotein	Virus Adsorption in die Wirtszelle
CXCR4- und CCR5-Rezeptor	Corezeptoren für Virus-Eintritt
gp41-Glycoprotein	Virus-Zell Fusion
HIV reverse Transcriptase	Bildung von proviraler DNA
HIV-Integrase	Integration proviraler DNA in das Genom der Wirtszelle
HIV-Protease	Spaltung von HIV-Proteinen

2.2.1 Down-Regulation von CD4

Das primäre Angriffsziel für HIV ist der CD4-Rezeptor der T-Zellen. Wirkstoffe, die mit diesem Rezeptor in Wechselwirkung treten, sollten daher den Viruseintritt verhindern können. Erste Erfolge konnten mit Cyclotriazadisulfondiamid **1** erreicht werden.¹²

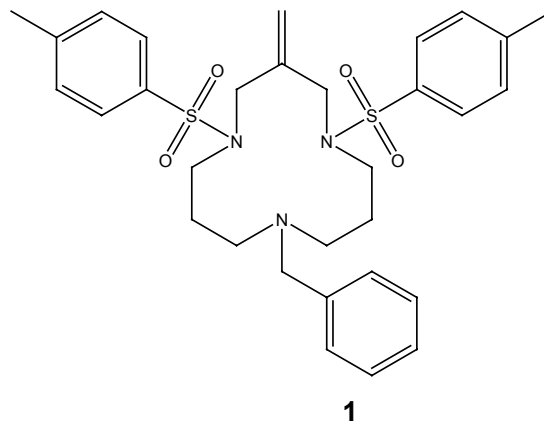


Abbildung 2.2: Cyclotriazadisulfondiamid **1**

Die antiviralen Eigenschaften von **1** und Derivaten hängen mit dem Herunterregulieren der Expression von CD4-Rezeptoren zusammen.¹³ Cyclotriazadisulfondiamid ist spezifisch für CD4 und scheint nicht direkt an den Rezeptor zu binden. Es wird vermutet, dass die Regulation auf Translationsebene erfolgt. Zusätzlich konnten synergistische Effekte gezeigt werden, wenn **1** mit anderen, bereits auf dem Markt erhältlichen Medikamenten verabreicht wird.¹⁴

2.2.2 Inhibitoren der Virusbindung (Entry-Inhibitoren)

Gegen die Bindung von HIV an die Wirtszelle werden zur Zeit verschiedene Wirkstoffe entwickelt, die eine Wechselwirkung von gp120 mit den CD4-, CXCR4- oder CCR5-Rezeptor inhibieren sollen. CXCR4 und CCR5 sind

Corezeptoren von CD4, mit denen das Glycoprotein gp120 nach der Bindung an CD4 in Wechselwirkung treten muss, um in die Zellen eintreten zu können.

2.2.2.1 gp120/CD4 Inhibitoren

1997 konnte Cyanovirin-N, ein 11 kDa Protein, isoliert aus dem Cyanobakterium *Nostoc ellipsosporum*, als gp120/CD4 Inhibitor identifiziert werden.¹⁵ Es zeigt eine sehr hohe Affinität für gp120 und ist imstande, gebundenes gp120 wieder von der Wirtszelle zu dissoziieren.¹⁶

Im Jahr 2003 wurden niedermolekulare Verbindungen beschrieben (BMS-378806 **2** und BMS-488043 **3**), die ebenfalls in der Lage sind, die Wechselwirkung zwischen gp120 und CD4 zu inhibieren.¹⁷

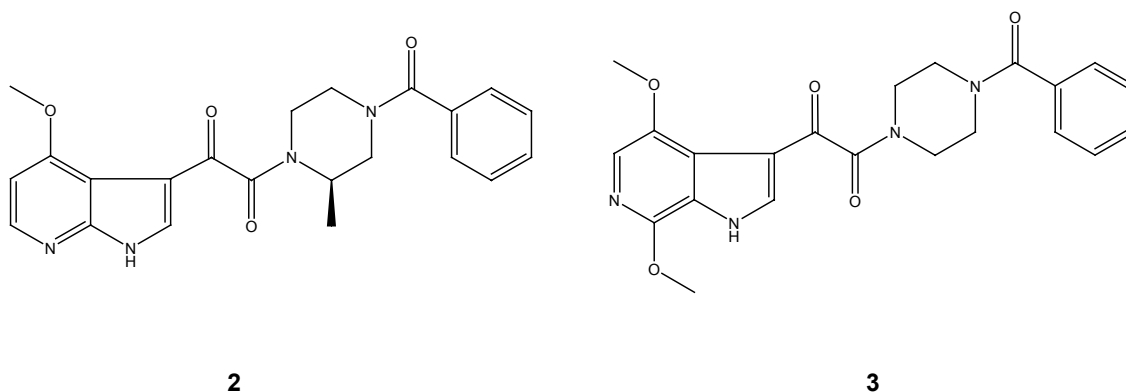


Abbildung 2.3: BMS-378806 **2** und BMS-488043 **3**

Beide Verbindungen befinden sich derzeit in klinischen Studien und zeigen gute pharmakologische Eigenschaften. Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht aufgeklärt, es wird jedoch vermutet, dass **2** und **3** konformationelle Änderungen bei gp120 entweder induzieren oder aber blockieren.

2.2.2.2 CXCR4 und CCR5 Antagonisten

Die Wechselwirkung von gp120 mit den CD4-Rezeptoren bewirken eine konformationelle Änderung der Struktur von gp 120, so dass es nun mit den Korezeptoren CXCR4 und CCR5 in Wechselwirkung treten kann. Daher sind diese beiden Korezeptoren ein potentiell Target für die Wirkstoffentwicklung. Inzwischen konnten einige niedermolekulare Antagonisten identifiziert werden, wobei die zur Zeit vielversprechendsten die Bicyclame **4** und **5** sind.¹⁸

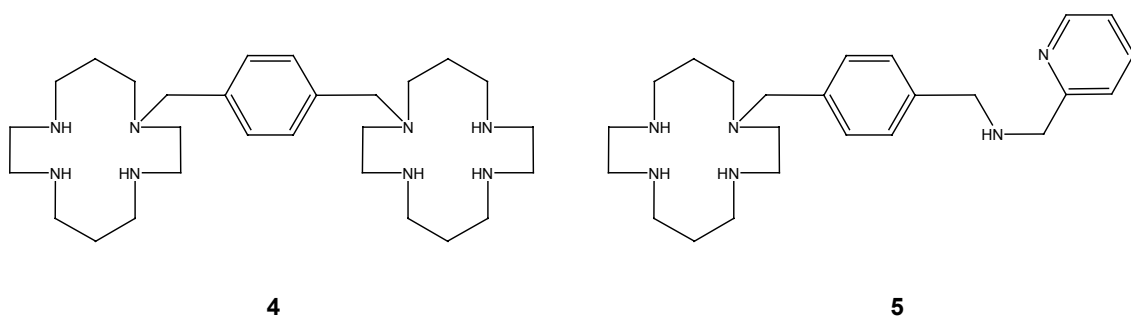


Abbildung 2.4: Strukturen der Bicyclame **4** (AMD3100) und **5** (AMD3465)¹⁰

Es konnte gezeigt werden, dass Verbindung **4** spezifisch mit dem CXCR4 Rezeptor eine Wechselwirkung eingeht, und nicht mit einem anderen CXCR oder CCR Rezeptor. Erste klinische Studien weisen daraufhin, dass **4** oral bioverfügbar ist.

Verbindungen **6** und **7** waren die ersten nichtpeptidischen Vertreter, die geeignet sind, durch eine Interaktion mit CCR5 die Virusreplikation in nanomolaren Konzentrationen zu blockieren.¹⁹

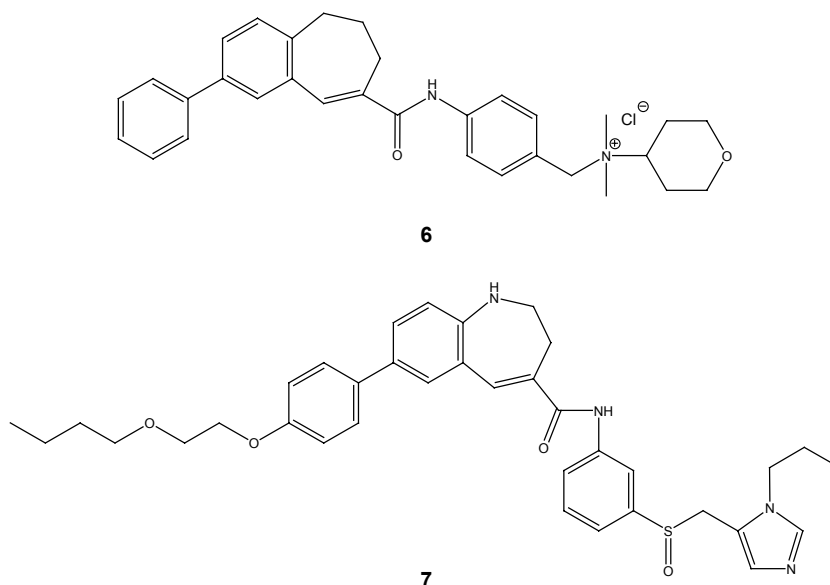


Abbildung 2.5: Strukturen der CCR5-Antagonisten **6** und **7**

Verbindung **6** ist nicht oral bioverfügbar und bei intravenöser Verabreichung zeigten sich deutliche Hautreizung an der Einstichstelle. Daher führten weitere Untersuchungen zu der Entwicklung von **7**. Diese Verbindung scheint, ersten Untersuchungen zu folge, oral resorbierbar zu sein und ist ebenfalls in der Lage, die Virusreplikation mit einer EC_{50} von 1.1 nM zu blockieren.

Ein weiterer Vertreter der CCR5-Antagonisten ist Verbindung **8** (SCH-C (SCH 351125)), welche sich schon in fortgeschrittenen klinischen Studien befindet und ein ausgezeichnetes pharmakokinetisches Profil zeigt.²⁰

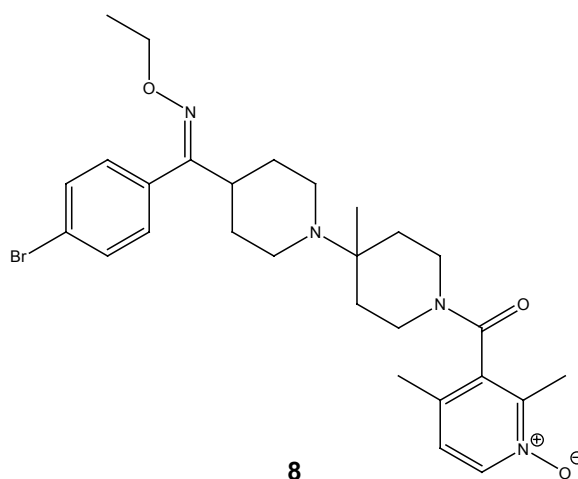


Abbildung 2.6: Struktur von SCH-C (SCH 351125) **8**

Die Bindestelle von **8** ist eine Einbuchtung, die durch die membranären Helices 1, 2, 3 und 7 gebildet wird. Es wird vermutet, dass die Bindung von **8** die Konformation der extrazellulären Seite, vor allem die des zweiten Loops, stört, so dass keine Interaktion mit gp120 mehr möglich ist.²¹

Eine weitere wichtige Klasse der CCR5-Antagonisten stellen 1,3,4,-trisubstituierte Pyrolidine dar. Abbildung 2.7 zeigt ein Derivat dieser Verbindungsklasse, das sich in frühen klinischen Studien befindet und gute anti-HIV Aktivität zeigt.²²

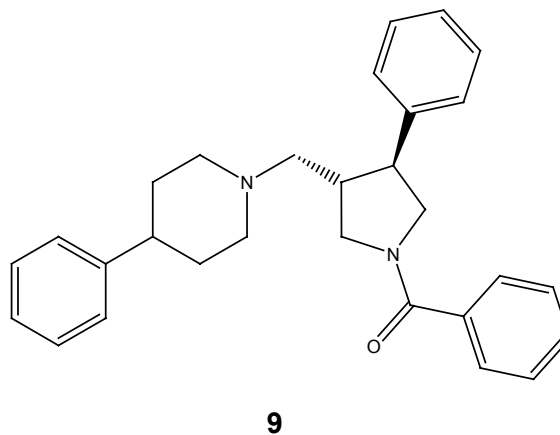


Abbildung 2.7: Struktur von **9**

2.2.2.3 Virus-Zell Fusion Inhibitoren

Nach der Wechselwirkung von gp120 mit den Rezeptoren der Wirtszelle folgt die eigentliche Fusion von Virus und Zelle. Hierbei ankert gp41 mit Hilfe seines Aminoterminus in der Wirtszelle und leitet die Verschmelzung der Virushülle mit der Membran der T-Zelle ein. Zu Beginn dieser Verschmelzung bilden sich hydrophobe Taschen, die zugänglich für Inhibitoren sind. Der bekannteste Inhibitor ist T20 (Enfuvirtid), ein synthetisches 36 Aminosäuren langes Peptid, das korrespondiert zu den Aminoresten 127-162 von gp41.

YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF

Abbildung 2.8: Aminosäuresequenz von T20 (Enfuvirtid)

In frühen Studien konnte gezeigt werden, dass T20 eine deutliche Reduktion der Virusreplication *in vivo* bewirkt.²³ Spätere klinische Phase III Studien belegten eine Reduktion der Virusbelastung bei gleichzeitiger Erhöhung der CD4-Zellen.²⁴ Deutliche Nachteile dieses Peptids bestehen allerdings darin, dass es nicht oral verabreicht werden kann sowie die hohen Produktionskosten, die für ein 5000 Da schweres Peptid anfallen. Daher wird versucht, einen neuen Ansatz zu finden. Dieser könnte in der Entwicklung von α -Helix-Mimetika, wie z.B. Verbindung **10**, zu finden sein (Abb. 2.9). Diese tris-funktionalisierten 3,2',2''-Terphenyl Derivate dienen als effektive Mimetika für die N-helikalen Regionen von gp41, die sich bei einer Übergangsphase der Zellfusion bilden. Dadurch ist es möglich, diese Phase zu stabilisieren und somit eine Fusion beider Zellen zu verhindern.

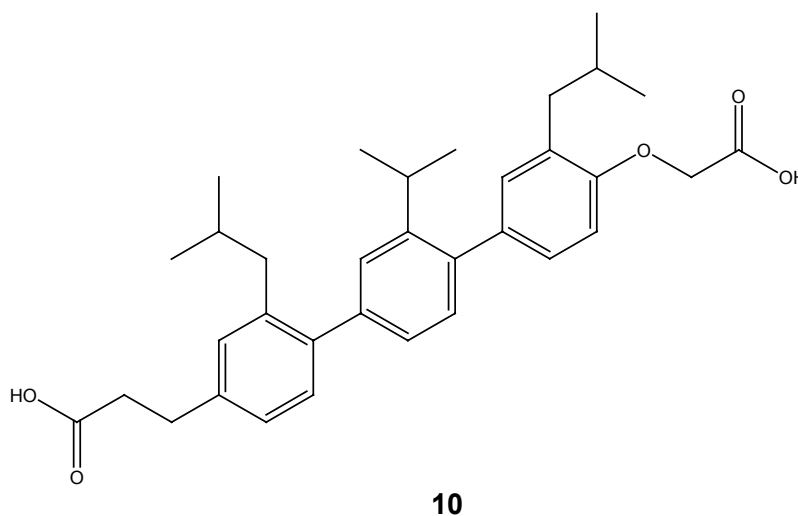


Abbildung 2.9: Terphenylderivat **10** als α -Helix Mimetika

Verbindung **10** kann eine durch HIV vermittelte Zellfusion *in vivo* zu verhindern, jedoch nur in relativ hohen Konzentrationen ($IC_{50} \approx 15 \mu\text{g/ml}$).²⁵

2.2.3 Inhibitoren der Virusreplikation (Post-Entry-Inhibitoren)

Die ersten Wirkstoffe zur Behandlung von HIV-Infektionen waren Inhibitoren der reversen Transkriptase. Diese werden nach ihrer chemischen Struktur in drei verschiedene Klassen unterteilt:

Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (**NRTIs**)

Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors (**NtRTIs**)

Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (**NNRTIs**)

Im Folgenden wird auf diese drei Klassen näher eingegangen.

2.2.3.1 Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs)

Die reverse Transkription ist einer der Schlüsselschritte im Replikationszyklus von HIV. Hierbei wird die virale RNA in doppelsträngige DNA überführt. Der therapeutische Ansatz für eine Inhibierung dieses Schrittes liegt in der Verabreichung von nicht natürlichen Nucleosiden, die in die DNA eingebaut werden und eine Kettenverlängerung der viralen DNA verhindern sollen. Dies gelingt dadurch, dass sich alle NRTIs durch das Fehlen einer 3'-OH Gruppe auszeichnen und sie so, nach erfolgtem Einbau, als Terminator fungieren. Da diese Nucleosidanaloga als Prodrug eingesetzt werden, müssen sie erst in ein aktives Triphosphat umgesetzt werden. Da HIV keine viralen Kinasen kodiert, muss dies durch die Kinasen der Wirtszelle geschehen. Die Aktivität der NRTIs hängt von verschiedenen Faktoren ab. Zum einen von dem Maß ihrer zellulären Aufnahme, sowie ihrer darauffolgenden Aktivierung in die Triphosphatform, zum anderen von ihrer Fähigkeit, in die virale DNA inkorporiert zu werden. Die folgende Abbildung zeigt eine Übersicht von NRTIs, die zur Zeit gegen HIV und AIDS eingesetzt werden.

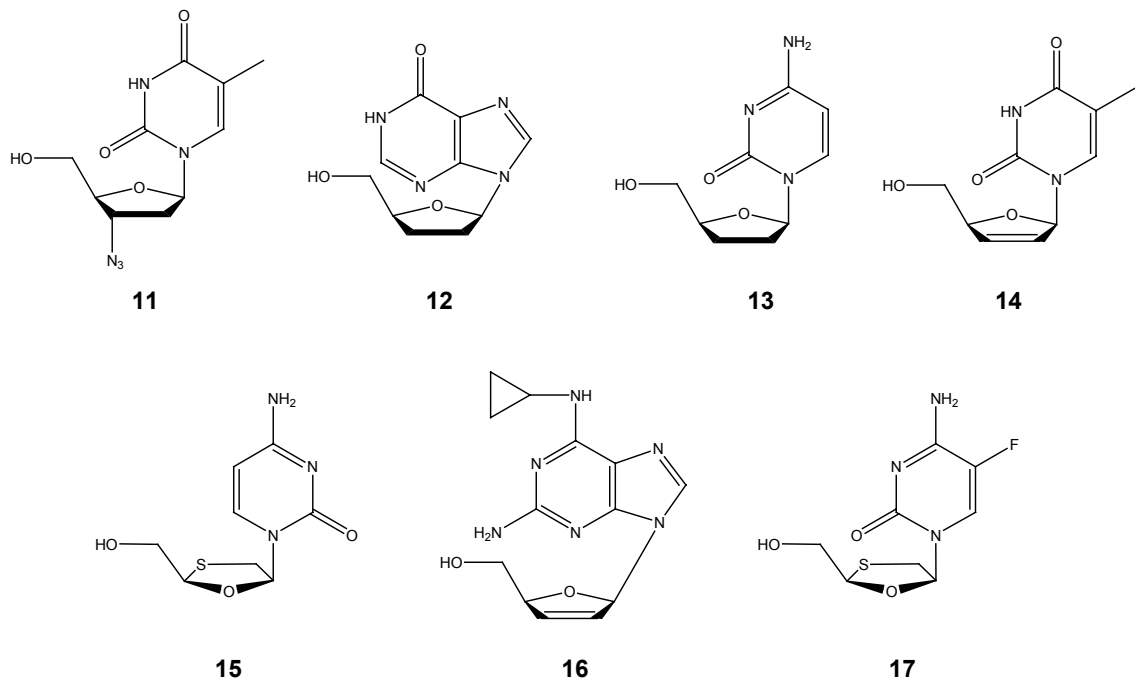
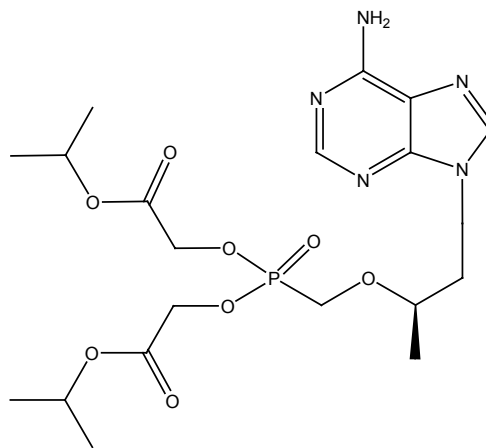


Abbildung 2.10: Auf dem Markt befindliche NRTIs: AZT (Retrovir[®]) **11**, Didanosin (Videx[®]) **12**, Zalcitabine (Hivid[®]) **13**, Stavudin (Zerit[®]) **14**, Larnivudin (Epivir[®]) **15**, Abacavir (Ziagen[®]) **16**, Emtricitabine (Emtriva[®]) **17**

2.2.3.2 Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors (NtRTIs)

Im Gegensatz zu den NRTIs besitzen die NtRTIs schon eine Phosphonatgruppe und benötigen daher nur noch zwei enzymatische Schritte um zum aktivierten Metaboliten umgewandelt zu werden. Ein weiterer struktureller Unterschied besteht darin, dass sie, im Gegensatz zu den NRTIs, über eine intakte Nucleosidbase verfügen, jedoch einen acyclischen Zuckerteil besitzen, der über eine P-C-Bindung über das Phosphonat verbunden ist. Sie wirken ebenfalls als alternatives Substrat für die reverse Transkriptase und als obligatorischer Kettenterminator.²⁶ Abbildung 2.11 zeigt die Struktur von Tenofovir (Viread[®]) **18**. Dieses Medikament ist für die Behandlung von HIV und gegen den Hepatitis B Virus (HBV) zugelassen. Da HBV ebenfalls eine reverse Transkriptase nutzt, die strukturell der von HIV sehr ähnlich ist, ist die Wirkweise dieselbe.

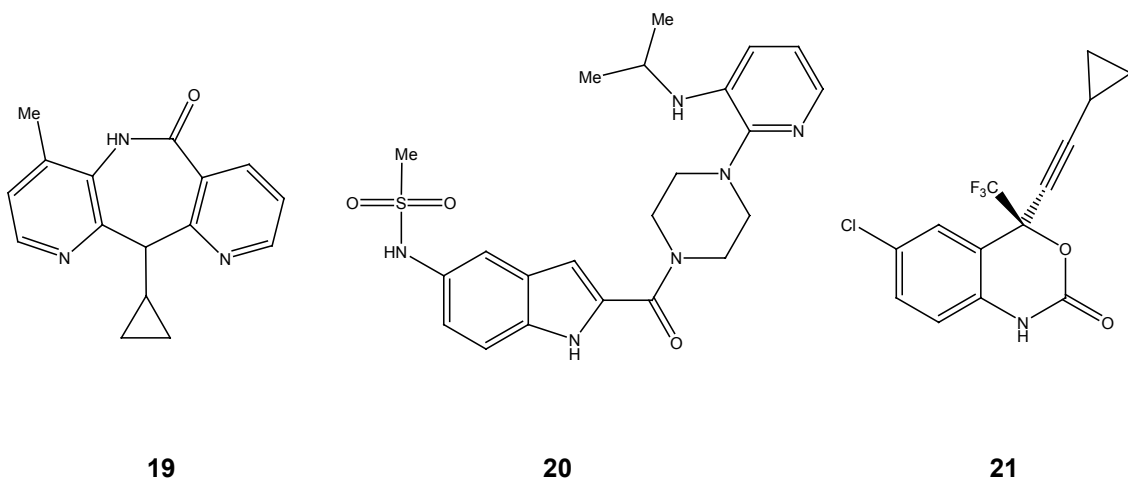


18

Abbildung 2.11: Struktur von Tenofovir (Viread®) 18

2.2.3.3 Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs)

Inzwischen wurden mehr als 30 strukturell unterschiedliche Klassen von NNRTIs identifiziert.²⁷ Sie sind spezifische Inhibitoren der HIV-1 Virusreplikation und inhibieren nicht die Replikation von anderen Retroviren wie z.B. HIV-2. Sie binden an spezifischen allosterischen Seiten des Enzyms, wie z.B. an nicht substratbindenden. Zur Zeit sind drei NNRTIs zugelassen, deren Strukturen die folgende Abbildung zeigt.



19

20

21

Abbildung 2.12: Nevirapin (Viramune®) 19, Delavirdin (Rescriptor®) 20, Efavirenz (Sustiva®) 21

Da diese Wirkstoffe der ersten Generation sehr schnell Resistenzen zeigen, vor allem wenn sie in der Monotherapie eingesetzt werden, werden nun Versuche unternommen, um eine zweite Generation von NNRTIs zu entwickeln. Erste Erfolge konnten mit Verbindung **22** erzielt werden²⁸, die sich zur Zeit in der klinischen Phase III befindet.

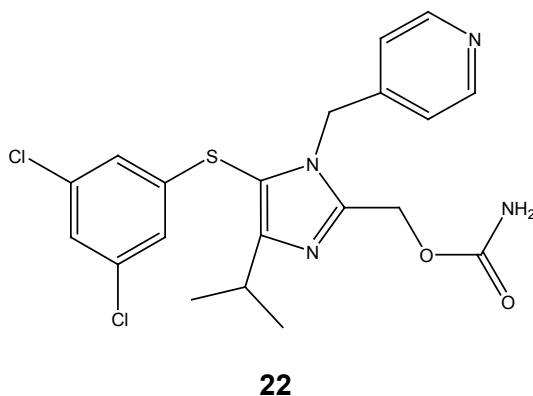


Abbildung 2.13: Capravirin **22**

Da die hier beschriebenen Inhibitoren meist unterschiedliche Nebenwirkungen haben, werden sie oft in der Kombinationstherapie eingesetzt.

2.2.3.4 HIV-Integrase Inhibitoren

Die Integration der proviralen DNA in das Genom der Wirtszelle ist ein entscheidender Schritt in der Replikation des HI-Virus. Dieser Prozess wird von der viralen Integrase ausgeführt, für die es kein homologes Enzym in der Wirtszelle gibt. Daher ist sie ein attraktives Ziel für HIV-Therapeutika. Es wurde eine Vielzahl von Molekülen als Inhibitoren der Integrase beschrieben, wobei es zwei dominante Klassen gibt.²⁹ Zum einen handelt es sich hierbei um catecholhaltige, hydroxylierte Aromaten, zum anderen um aromatische Diketosäuren. Ein frühes Beispiel für die erste Substanzklasse ist L-Chicoricsäure **23**. Die spezifische Inhibierung der Integrase durch **23** wird

dadurch deutlich, dass bereits eine einzige Punktmutation (G140S) des Enzyms zu einer Resistenz führt.³⁰

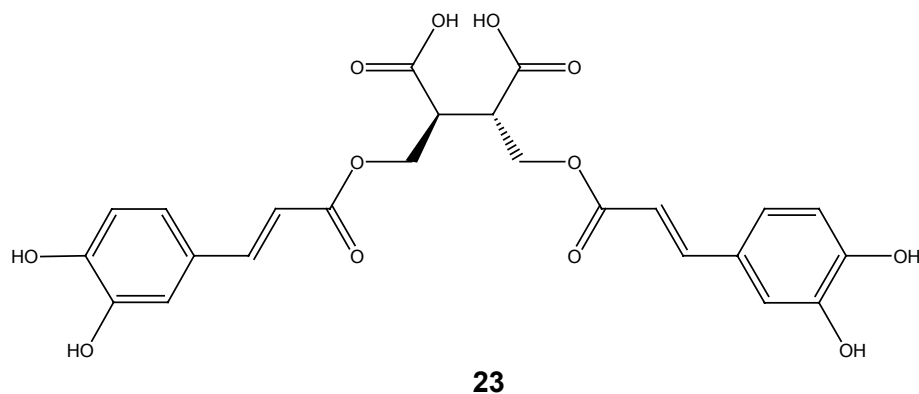


Abbildung 2.14: L-Chicoricsäure **23**

Für die Entwicklung weiterer Derivate der Diketosauren diene die Röntgenstruktur von 5CITEP **24** in einem Komplex mit der HIV-1 Integrase als Ausgangspunkt.³¹ Basierend darauf wurden Verbindung **25** und **26** identifiziert, die beide imstande waren, in Zellkulturen die Virusreplikation zu unterdrücken.³²

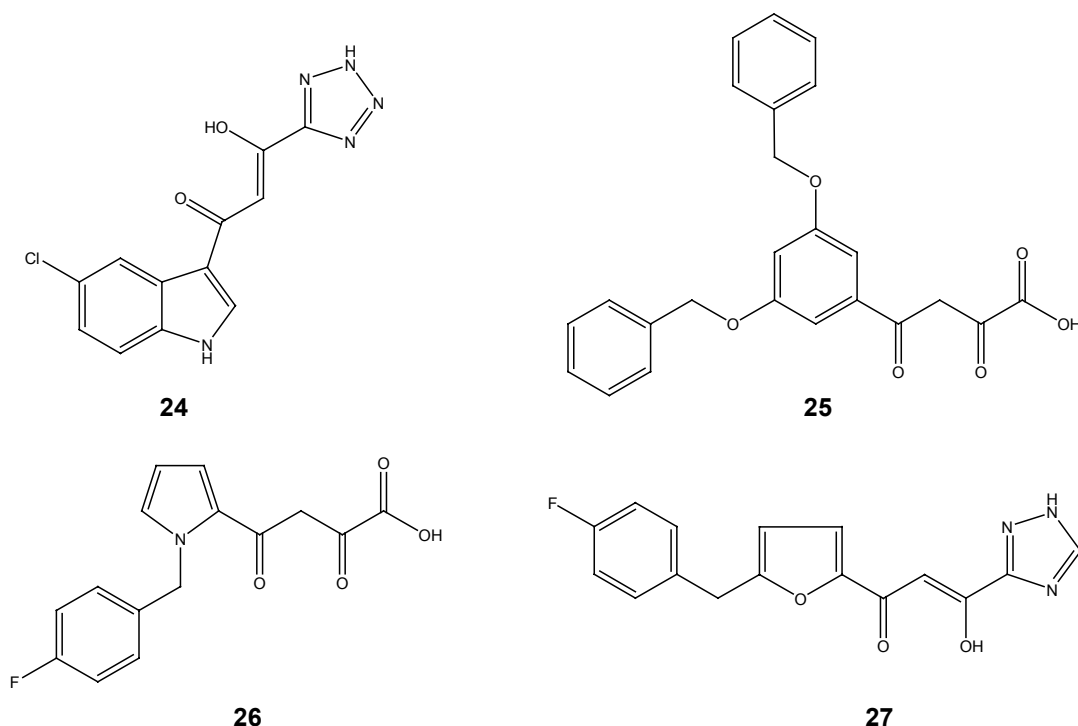


Abbildung 2.15: Strukturen der HIV-1 Integrase Inhibitoren 5CITEP **24**, L-708,906 **25**, L-731,988 **26** und S-1360 **27**

Verbindung **27** ist der erste Inhibitor, der klinische Phase I/II Studien erreicht hat. Sie inhibiert die HIV-1 Integrase mit einem IC_{50} -Wert von 20 nM und die HIV-Replikation mit einem EC_{50} -Wert von 140 nM und besitzt zur Zeit die höchste Selektivität eines Integrase Inhibitors. Der vermutete Wirkmechanismus dieser vier Verbindungen besteht in einer Wechselwirkung der Carboxylatgruppe, bzw. des isosterischen Heterocyclus, mit Metallionen im aktiven Zentrum der Integrase, die wichtige Kofaktoren darstellen.³³

2.2.3.5 HIV-Protease Inhibitoren

Die letzte große Klasse der HIV-Wirkstoffe stellen die HIV-Protease-Inhibitoren dar. Diese sind in der späten Phase der HIV-Replikation verantwortlich für die Spaltung der gag und pol-gag Vorläufer Polypeptide in die strukturellen Proteine p17, p24, p7, p6, p2, und p1, sowie in die funktionellen Proteine

Protease p11, reverse Transkriptase p66/p51 und die Integrase p32. Inhibitoren der Protease verhindern somit den Aufbau von infektiösen Viruspartikeln. Alle bisher zugelassenen Proteasehemmer, wie z.B. Crixivan[®], Invirase[®] oder Agenerase[®], sind Peptidmimetika mit einer Hydroxyethylenbindung anstelle einer Peptidbindung. Daher ist es der Protease nicht möglich, diese Bindung zu brechen. Ein Nachteil dieser Verbindungen ist, dass sehr schnell Resistenzen aufgebaut werden. Daher steigt der Bedarf an neuen Peptidmimetika ständig. Das Azadipeptid Analogon Atazanavir **28** ist der neuste für den Arzneimittelmarkt zugelassene Protease-Inhibitor. Dieses zeigt ein bevorzugtes pharmakologisches Profil, das eine tägliche Einmal-Dosis erlaubt.³⁴

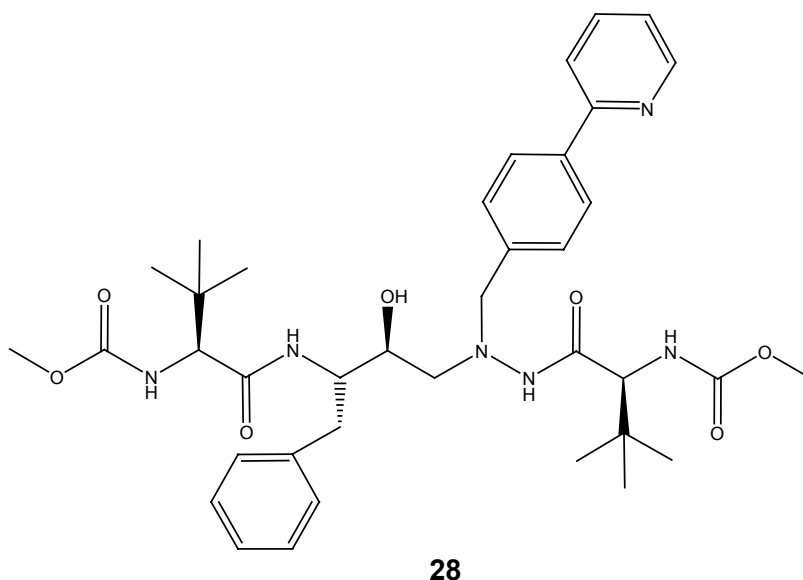


Abbildung 2.16: Struktur von Atazanavir **28**

Obwohl es mit den in diesem Kapitel vorgestellten Anti-HIV-Wirkstoffen möglich ist, den Ausbruch von AIDS um Jahrzehnte hinauszuzögern, wird dennoch deutlich, dass ein Hauptproblem der Behandlung in der durch Mutationen ausgelösten Resistenz gegen die Wirkstoffe besteht. Daher ist es nötig, neue Wirkstoffziele für die Unterbrechung der HIV-Replikation zu identifizieren. Hierauf soll im nächsten Kapitel näher eingegangen werden

3 RNA-Liganden

Lange Zeit wurde RNA nicht als Target-Molekül für die Entwicklung von Wirkstoffen in Betracht gezogen. Sie wurde in letzter Konsequenz nur als ein Vermittler der genetischen Information von der DNA hin zum Protein angesehen. Als therapeutisches Target ist RNA, im Gegensatz zu DNA, deutlich unterrepräsentiert. Dabei besitzt RNA gegenüber DNA entscheidende Vorteile. So ist chromosomale DNA dicht gepackt, wodurch der Zugang von kleineren Wirkstoffmolekülen erschwert wird. Außerdem existieren mehrere Reparaturmechanismen für DNA. Für RNA sind solche Reparaturmechanismen bislang nicht bekannt.

Inzwischen wurde eine große Anzahl von RNA-Protein Wechselwirkungen in der Literatur beschrieben. Dabei zeigte sich, dass RNA sehr viele verschiedene, wohldefinierte Strukturen einnehmen kann und zudem in vielen regulatorischen Prozessen der Zelle eine entscheidende Rolle spielt. Die zahlreichen Krankheiten, die durch RNA-Viren verursacht werden, einschließlich AIDS und Hepatitis C, machen deutlich, wie hilfreich Wirkstoffe, die gegen RNA gerichtet sind, sein könnten. In den letzten Jahren ist es durch hochauflösende NMR-Spektroskopie^{35,36} und Röntgenstrukturanalyse^{37,38} gelungen, eine Vielzahl von dreidimensionalen RNA-Strukturen aufzulösen. Durch die so ermöglichten Einblicke in die Struktur ist es möglich, Wirkstoffe zu entwickeln, die selektiv mit einer Target RNA wechselwirken und so ihre Funktion beeinträchtigen. Die nachfolgenden Kapitel geben einen Überblick über die verschiedenen Strukturen von RNA sowie die Arten der Wechselwirkungen, die ein Molekül mit der RNA eingehen kann.

3.1 Strukturmotive von RNA

RNA ist in der Lage, eine Vielzahl von Sekundärstrukturen auszubilden. Abbildung 3.1 zeigt verschiedene Beispiele hierfür.

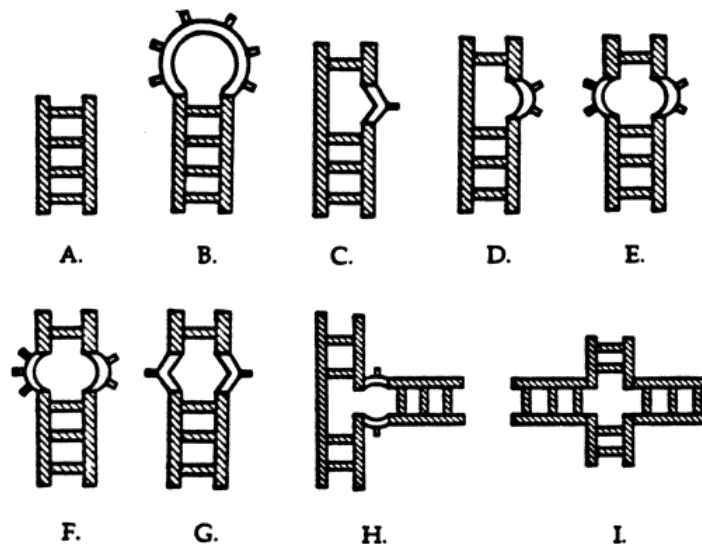


Abbildung 3.1: Darstellungen von RNA-Sekundärstrukturen: (A) Duplex, (B) hairpin loop, (C) single-base bulge, (D) multiple-base bulge, (E) symmetric internal loop, (F) asymmetric internal loop, (G) mismatch loop, (H) three-steem junction und (I) four-steem junction. Watson-Crick Basenpaarungen sind schraffiert, Einzelstrangbereiche farblos dargestellt³⁹

Große hairpin-loop-Strukturen finden sich vor allem als Komponenten der tRNA, während sich kleinere Hairpins mit vier Nucleotiden in ribosomaler RNA finden lassen. Bulges bilden sich immer dann, wenn in einem Duplex eine ungerade Anzahl von Basen gepaart werden sollen. Wenn die bulge-Region aus nur einem ungepaarten Nucleotid besteht, kann das ungepaarte Nucleotid entweder in den Duplex hineinragen oder aber davon weg stehen. Dies hängt von der Zusammensetzung der umgebenden Basen ab.

Multiple-base-bulges haben einen anderen Effekt auf die RNA-Struktur, wie zum Beispiel eine Reduzierung der Stabilität der Duplexe. *Weeks* und *Crothers*

vermuten, dass einige *bulges* für die Aufweitung der großen Furche verantwortlich sind und so erst eine Bindung von Proteinen oder kleinen Molekülen ermöglichen.⁴⁰ Ein weiteres Strukturmotiv der RNA ist die Bildung von Tripelhelices. Dieses Strukturmotiv liegt einer Tripelbasen-Wechselwirkung zugrunde. Abbildung 3.2 zeigt ein Beispiel hierfür.

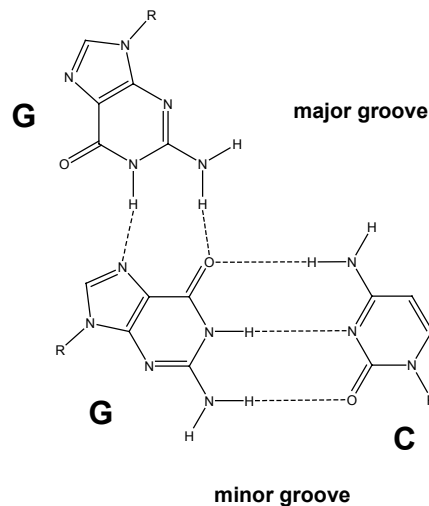


Abbildung 3.2: Typische Tripelbasen-Wechselwirkung zwischen G-G-C, wie sie z. B. in tRNA gefunden wird³⁹

3.2 Arten von RNA-Ligand Wechselwirkung

Die unterschiedlichen Arten von RNA-Ligand Wechselwirkungen lassen sich in spezifische und unspezifische Wechselwirkungen unterteilen.

Unter unspezifischen Wechselwirkungen wird im allgemeinen verstanden, dass ein Ligand an verschiedenen, unspezifischen Stellen entlang einer RNA bindet, während bei einer spezifischen Wechselwirkung nur ein bestimmtes Strukturmotiv einer RNA erkannt wird. Ein weiteres, in der Literatur oft

genanntes Kriterium für eine spezifische Wechselwirkung ist, dass ein Ligand der spezifisch an einer RNA bindet, nicht gleichzeitig eine hohe Affinität zu DNA oder anderen Makromolekülen aufweisen darf.

Die nichtkovalente Bindung von Liganden an RNA kann in drei verschiedene Arten eingeteilt werden (Abbildung 3.3).

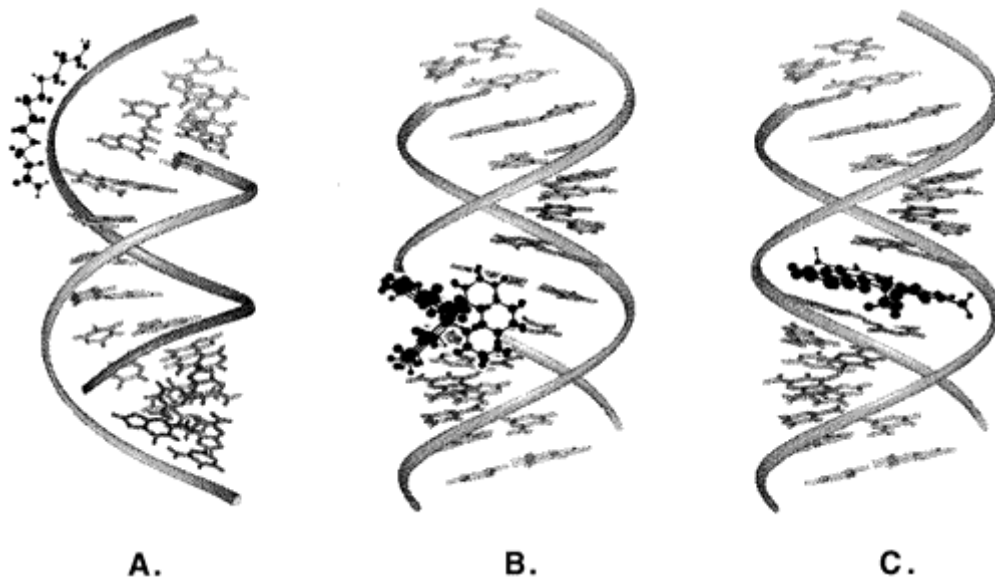


Abbildung 3.3: Darstellung von drei verschiedenen Arten der Wechselwirkung von Liganden mit RNA. (A) elektrostatische Wechselwirkung mit dem Phosphatrückgrat, (B) Bindung in der Furche und (C) Intercalation³⁹

Figur **A** zeigt die Wechselwirkung zwischen einem kationischen Liganden mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrates der RNA. Diese Art der Wechselwirkung ist vergleichsweise sehr unspezifisch, ist jedoch fähig, die Annäherung des Liganden an die RNA zu ermöglichen, da sie über eine größere Distanz wirksam ist. In **B** wird die Möglichkeit der Bindung in den Furchen der RNA dargestellt. Diese erfordert entweder Wasserstoffbrückenbindungen und/oder van der Waals Wechselwirkungen mit den Basen. Der Ort dieser Bindung ist meist die *major groove* der RNA-Helix. Im Falle einer nichtkanonischen Basenpaarung (z. B. einem *multiple base bulge*) kommt es zu

einer Aufweitung der *major groove* und so zu einem erleichterten Zugang für den Liganden. **C** zeigt schließlich die Möglichkeit der Intercalation eines Liganden in eine RNA-Helix. In diesem Fall ist es nötig, dass die RNA die Helixstruktur aufweitet, um den Liganden aufzunehmen. Planare, heteroaromatische Liganden sind in der Lage, so in eine RNA (oder auch DNA) zu intercalieren und sich senkrecht zu der Helixachse zu positionieren.

3.2.1 Elektrostatische Wechselwirkungen

Durch das Phosphatrückgrat besitzt die RNA einen polyanionischen Charakter. Dadurch spielen elektrostatische Wechselwirkungen eine große Rolle bei der Bildung von RNA-Ligand-Komplexen. Daher findet man in den meisten RNA-Liganden eine oder mehrere positiv geladene Gruppen. Diese Wechselwirkungen sind durch ihre fehlende räumliche Orientierung sehr oft unspezifisch, jedoch konnte man bei Aminoglycosiden zeigen, dass sie spezifisch an RNA binden, wenn eine elektrostatische Komplementarität in der räumlichen Verteilung der negativen Bindungstaschen einer RNA besteht.⁴¹

3.2.2 Wasserstoffbrückenvermittelte Wechselwirkungen

Wasserstoffbrücken zwischen den Phosphatgruppen des RNA-Rückgrats als Acceptoren und den Wasserstoffatomen des Liganden als Donatoren leisten bedeutende Beiträge zu der Stabilität der RNA-Ligand-Komplexe. Ebenso können Wassermoleküle an der Wasserstoffbrückenbildung in Komplexen beteiligt sein. Ein Beispiel hierfür ist ein RNA-Aptamer-Tobramycin-Komplex. Hier kommt es zu einer wasservermittelten Wasserstoffbrücke zwischen einer Hydroxygruppe des Aminoglycosids und dem N7-Atom eines Adenins.⁴²

3.2.3 Wechselwirkungen durch Stapelung und Intercalation

Die Basen von RNA-Molekülen stehen als Oberfläche für Stapelwechselwirkungen zur Verfügung. Grundlage hierfür sind hydrophobe

Effekte, *van der Waals*-Wechselwirkungen und vor allem Wechselwirkungen zwischen den aromatischen π -Elektronensystemen.¹⁵ Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, sind vor allem planare, heteroaromatische Systeme geeignet, solche Stapelwechselwirkungen zu fördern und in eine RNA-Struktur zu intercalieren.

Intercalation ist aufgrund der physikalischen Natur der dabei vorliegenden Wechselwirkungskräfte relativ unspezifisch. Eine Klasse von RNA-Liganden, die hervorragende Intercalationseigenschaften aufweisen, sind aminomodifizierte Acridine, deren chemisches Grundgerüst Abbildung 3.4 zeigt.

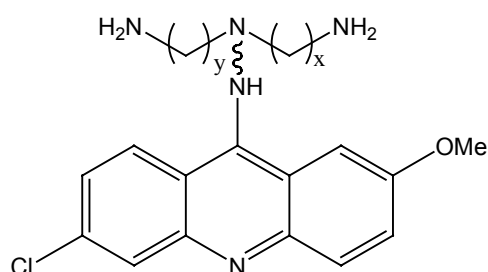


Abbildung 3.4: Grundgerüst von aminomodifizierten Acridinen

Der Acridinrest soll Stapelwechselwirkungen, der polykationische Rest gleichzeitig elektrostatische Wechselwirkungen vermitteln. Und obwohl dieser Ansatz einige vielversprechende Liganden für das HIV-tat-TAR-System lieferte, zeigten verschiedene Verbindungen erhebliche Affinitätsunterschiede, die nicht allein über eine Struktur-Wirkungs-Beziehung erklärt werden konnten.⁴³

Für die Bindung dieser Stoffklasse an RNA wurde eine nichtklassische Intercalation vorgeschlagen, die sich von der klassischen dadurch unterscheidet, dass es zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Acridinrest und den Basen der RNA kommt.¹⁹ Es wird vermutet, dass eine Festlegung der Flexibilität der Seitenkette die Spezifität noch erhöhen könnte.

Bei der Entwicklung von RNA-Liganden griff man auf die Erfahrungen bei der Entwicklungen von DNA-Komplexen zurück. Es überrascht daher nicht, dass

Intercalatoren und Moleküle, die in den Furchen binden, zu den ersten getesteten Verbindungen gehörten.

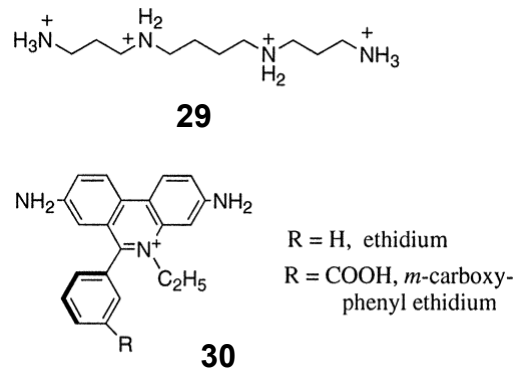


Abbildung 3.5: Chemische Strukturen von Spermin **29** und Ethidium **30**

1978 gelang es, das Polyamin Spermin **29** als Komplex mit tRNA^{Phe} (Abb. 3.6) zu kristallisieren und seine Struktur durch Röntgenstrukturanalyse mit einer Auflösung von 2.5 Å, aufzuklären.⁴⁴ Dadurch konnte gezeigt werden, dass das Spermin zwei Hauptbindungsstellen hat. Die erste befindet sich in der *major groove* am Ende des Anticodons, die zweite in einer variablen *loop*-Region in der Nähe des Phosphat-10 an einem *turn* im RNA-Rückgrat.

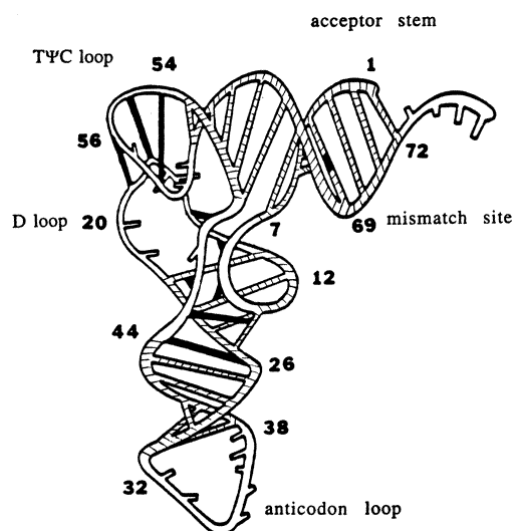


Abbildung 3.6: Darstellung der dreidimensionalen Struktur von tRNA, basierend auf der Kristallstruktur von tRNA^{Phe}⁴⁴

Ein weiteres frühes Beispiel für einen RNA-Liganden ist Ethidium **30** und seine Derivate. Studien in Lösung wiesen darauf hin, dass **30** vermutlich ähnlich in tRNA intercaliert wie in DNA.⁴⁵ Im Gegensatz dazu konnte durch Röntgenstrukturuntersuchungen gezeigt werden, dass **30** bei tRNA aus Hefe einen nichtintercalativen Bindungsmodus eingeht.⁴⁶ Dadurch konnte deutlich gezeigt werden, dass die Art der Bindung eines RNA-Liganden eine starke Abhängigkeit von der tertiären Struktur der RNA aufweist.

Trotz dieser frühen Erfolge erkannte man schnell, dass aufgrund der weitgehenden Unterschiede der dreidimensionalen Struktur von DNA und RNA die Methoden zur Entwicklung von DNA-Liganden nicht auf RNA-Liganden übertragbar sind. Die spezifische Erkennung von RNA ist eher mit der spezifischen Erkennung von Proteinen vergleichbar, auch wenn bei der Bindung von Effektormolekülen an die RNA die Energiebeiträge anders gewichtet sind als bei der Bindung an Proteine. Diese setzen sich zusammen aus elektrostatischen Kräften, Wasserstoffbrückenbindungen, sowie verschiedenen nichtkovalenten Wechselwirkungen, wie *van der Waals*-, Stapel- und hydrophoben Wechselwirkungen.⁴⁷

3.3 TAR-RNA aus HIV-1

Als ein neues Ziel für die Entwicklung von Wirkstoffen gegen HIV kristallisierten sich in den letzten Jahren die RNA-Strukturen TAR und RRE heraus. Beide RNAs sind essentiell für die Replikation von HIV und gehören bis heute zu den am besten charakterisierten RNA-Strukturen. Es wurden eine Vielzahl von Liganden identifiziert, die in der Lage sind, an diese RNAs zu binden und so eine Wechselwirkung mit ihren Proteinen tat, bzw. rev, zu stören. Im Folgenden soll nun auf das tat-TAR-System näher eingegangen werden.

3.3.1 Tat-TAR Wechselwirkungen

Die Tat-TAR-Wechselwirkung, welche eine essentielle Rolle bei der Replikation des HIV-Genoms spielt, war und ist Gegenstand sehr detaillierter Untersuchungen. Hierauf wird nun näher eingegangen werden.

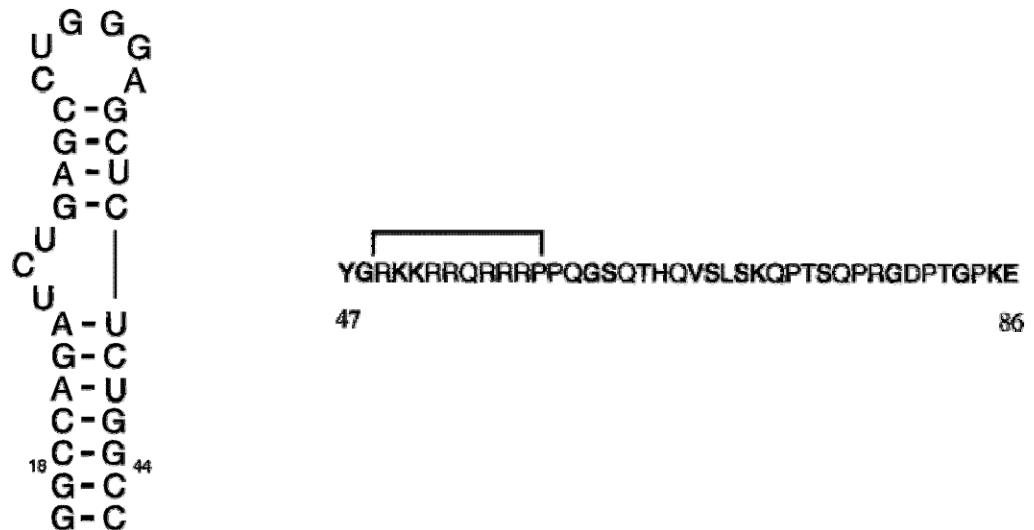


Abbildung 3.7: links: Sequenz der Sekundärstruktur eines 31mer TAR-RNA-Analogon; rechts Aminosäuresequenz (47-84) des tat-Peptides. Hervorgehoben ist die Region die essentiell für die Wechselwirkung mit TAR ist

HIV-1-tat, (*trans-activator protein*), ist ein 86 Aminosäuren umfassendes, argininreiches Protein, dessen vollständige Sekundärstruktur noch nicht aufgeklärt werden konnte. Zimmermann konnte jedoch 1990 durch genetische Studien beweisen, dass die Reste 48-57, welche reich an Arginin und Lysin sind (Abbildung 3.7, rechts), eine unabdingbare Voraussetzung für die Wechselwirkung mit TAR bilden.⁴⁸

HIV-1-TAR liegt im Bereich einer Haarnadelschleife, an die das virale Tat-Protein bindet. TAR besteht aus 59 Nucleotiden und befindet sich am 5'-Ende aller entstehenden HIV-Transkripte. Seine Sekundärstruktur zeichnet sich durch zwei charakteristische Regionen aus. Die *bulge*-Region ist der Bereich der Wechselwirkung mit tat, während die *loop*-Region für die Aktivierung der

Transkription von Bedeutung ist.⁴⁹ Während der Bindung von tat an die TAR vollzieht diese eine große strukturelle Änderung. Die Nucleotide 23-25 des bulges werden nach außen gedreht und die beiden stem-Regionen bilden einen geringeren Winkel zueinander. Ein Guanidiniumrest des tat-Protein bindet in der großen Furche und kommt so in einen nahen Kontakt zu Guanosin-26. Das Uridin-23 bildet hierbei eine Art Basentriplett mit Adenosin 27 und Uridin-38 (s. folgendes Kapitel). Zelluläre Proteine wie Cyclin T1 und CDK9 binden anschließend an den tat-TAR-Komplex. Abschließend erfolgt die Phosphorylierung der RNA Polymerase II an der C-terminalen Domäne. Die Folgen sind eine Steigerung der Initiationsfrequenz, sowie Prozessivität der viralen mRNA-Synthese.⁵⁰

3.4 Beispiele für TAR-Liganden

Die ersten Beispiele für TAR-Liganden waren argininhaltige Peptide, einschließlich Arginin selbst, bzw. sein Analogon Argininamid, mit dem viele NMR-Strukturen gelöst wurden. Die darauf folgenden TAR-Liganden lassen sich in drei Klassen einteilen. Die erste große Gruppe sind die Aminoglycoside, die schon früh als RNA-Binder identifiziert wurden. Die zweite Gruppe sind „small molecules“ mit einem Molekulargewicht unter 500 Da, die auf unterschiedlichen Wegen identifiziert wurden. Die dritte Gruppe stellen peptidische Strukturen dar. Im Folgenden wird auf diese bisher gefundenen TAR-Liganden näher eingegangen.

3.4.1 Arginin und Argininamid

Nachdem die Bedeutung des tat-TAR-Systems für die virale Replikation erkannt wurde, zielten viele Ansätze auf die Entwicklung von Liganden, die imstande sind, an die TAR-RNA zu binden.

Aufgrund der Untersuchungen von *Zimmermann* versuchte die Arbeitsgruppe um *Frankel*, kurze Peptidsequenzen zu entwickeln, die an TAR binden sollten.⁵¹ Zu diesem Zweck wurde ein Peptid hergestellt, das aus 9 Lysinbausteinen zusammengesetzt war. Jedoch zeigte dieses Nonamer deutlich schlechtere Bindungseigenschaften, als Tat zutrafen. Es wurden daraufhin weitere Nonamere synthetisiert, in denen einzelne oder mehrere Lysine durch Arginin ersetzt wurden. Diese Peptide wurden auf ihre Bindung an TAR untersucht. Durch diese systematische Untersuchung konnte *Frankel* zeigen, dass bereits die Substitution eines Lysins durch Arginin eine dramatisch höhere Bindung an TAR bewirkte

Williamson gelang es 1992, die Struktur eines Komplexes von TAR mit Argininamid zu untersuchen.⁵² Aus einem begrenzten NMR-Datensatz konnte er eine Bindungshypothese aufstellen, die im Folgenden dargestellt wird.

Es konnte gezeigt werden, dass TAR nach Bindung von Argininamid eine deutliche Konformationsänderung eingeht. NMR-Studien von *Puglisi* konnten eine spezifische Bindungsstelle für Argininamid (oder Arginin) identifizieren²⁰. Dabei kommt es zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen dem Nucleotid G26, den Phosphaten P22 und P23 und der Guanidiniumgruppe in der Seitenkette des Arginins. Die Autoren vermuteten die Ausbildung eines Basentriplets zwischen den für die Bindung an Tat wichtigen Basen U23 und dem Basenpaar A27-U38. Abbildung 3.8 zeigt dies in einem Schema.

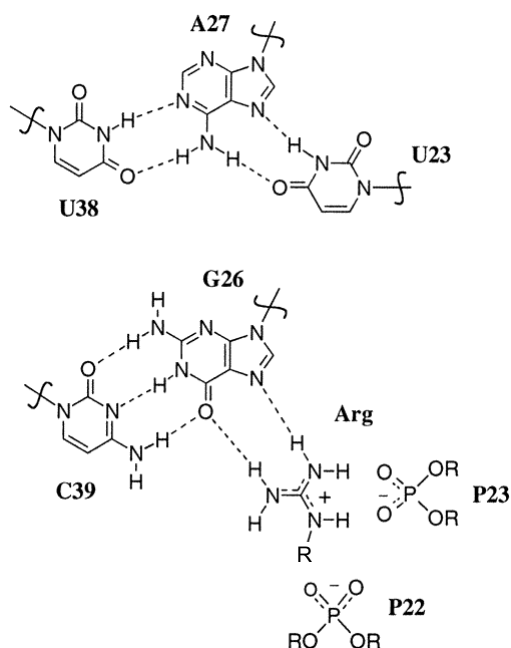


Abbildung 3.8: Schema des vermuteten Basentriplets bei der Bindung von Argininamid an TAR

Die Frage, ob es tatsächlich zu der Ausbildung eines Basentriplets kommt, wird heftig diskutiert, da die NMR-Studien von *Puglisi* keinen direkten Beweis für das Vorhandensein eines Basentriplets liefern konnten. Weitere Anhaltspunkte für ein Basentriplett konnten jedoch durch NMR-Untersuchungen an Mutanten von HIV-1-TAR erhalten werden.⁵³

In einer darauffolgenden NMR-Untersuchung von *Aboul-ela* konnte durch genauere Daten dann die volle Struktur des Argininamid-TAR-Komplex aufgeklärt werden.⁵⁴ Er konnte zeigen, dass in der gebundenen Form C24 und C25 in das Solvens ragen, während U23 in die Nachbarschaft zu A27 wandert. Doch selbst wenn U23 seine Position durch eine Aufweitung der *major groove* verändert, ist der Abstand relativ groß, um eine starke Wechselwirkung mit A27 einzugehen. Daher schloss *Aboul-ela* die Bildung eines echten U23-A27-U38 Basentriplets aus, nicht aber die einer triplett-ähnliche Struktur.

In einer 1999 erschienen NMR-Studie von *Long* und *Crothers*⁵⁵ von TAR, gebunden an ein 24 Aminosäuren umfassendes Teilstück von Tat, wiesen die

Autoren auf die Existenz dieses Basentriplets hin. Begründet wurde dies durch die Beobachtung von NOEs zwischen U23 und den Iminprotonen von A27. 2000 wurden moleküldynamische Rechnungen von Kollman zu diesem Problem veröffentlicht.⁵⁶ Diese geben auch einen Hinweis für das Auftreten eines Basentriplets in der gebundenen Form von TAR.

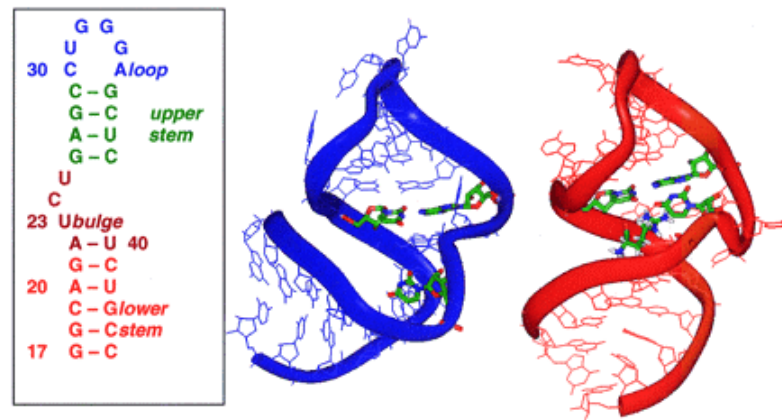


Abbildung 3.9: Sekundärstruktur von HIV-1-Tar (links), sowie NMR-Strukturen von gebundener (mitte) sowie freier TAR-RNA (rechts)⁵⁵

Das Vorhandensein eines Basentriplets ist im Fall der TAR von HIV-2 deutlicher belegt und daher nicht so umstritten. 1997 konnte wiederum *Williamson* die Struktur von HIV-2-TAR in einem Komplex mit Argininamid NMR-spektroskopisch aufklären.⁵⁷

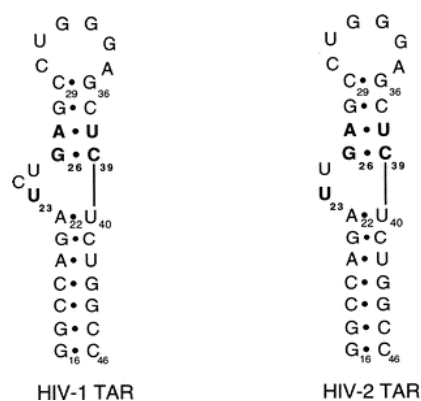


Abbildung 3.10: Strukturunterschiede von HIV-1- und HIV-2-TAR⁵⁷

Die Struktur von HIV-2-TAR unterscheidet sich, wie man Abbildung 3.10 entnehmen kann, durch das Fehlen eines Nucleotides im *bulge*, welches für die Wechselwirkung mit Argininamid keine Rolle spielt. Mit Hilfe von mehrdimensionaler, heteronuklearer NMR-Spektroskopie gelang es zu beweisen, dass zumindest in einem Argininamid-HIV-2-TAR-Komplex eindeutig ein Basentriplett entsteht. Abbildung 3.11 zeigt ein Modell, das auf den NMR Daten beruht.

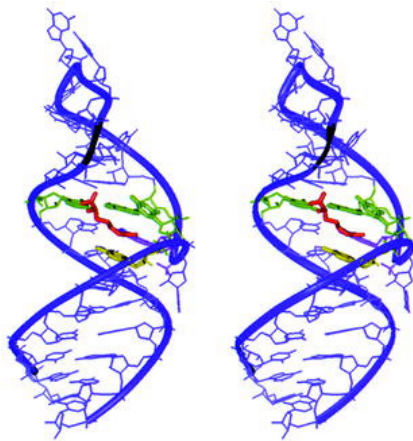


Abbildung 3.11: Struktur von HIV-2-TAR in einem Komplex mit Argininamid. U23 ist grün, G26 in lila, A22 in gelb und Argininamid in rot dargestellt

Durch eine Ausschnittsvergrößerung wird die Bindung noch deutlicher. In Abbildung 3.12 erkennt man die *major groove*, in der das Argininamid (rot) bindet. Das Argininamid bildet zusammen mit U23 (grün) und A22 (gelb) π - π -Wechselwirkungen aus.

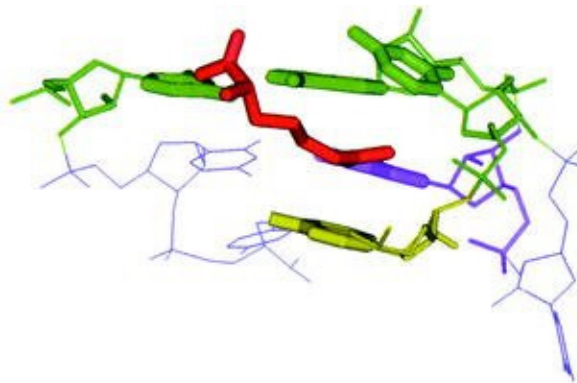


Abbildung 3.12: π - π -Wechselwirkungen von Argininamid

Abbildung 3.13 zeigt einen Blick entlang der Helixachse. Das sich ausbildende Basentriplett zwischen U38-A27-U23 (die Basen sind grün hervorgehoben) ist deutlich zu erkennen.

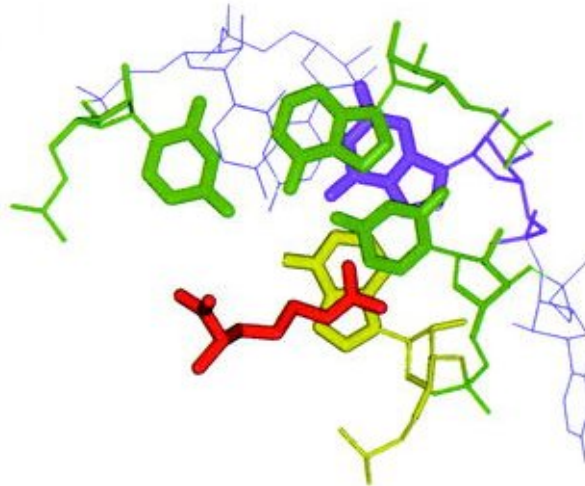


Abbildung 3.13: Blick entlang der Helixachse. Das Basentriplett U38-A27-U23 ist grün hervorgehoben

3.4.2 Aminoglycoside

Im Gegensatz zu den klassischen Intercalatoren, die RNA (und DNA) unspezifisch binden,⁵⁸ zeigen Aminoglycoside eine nichtintercalative Bindung, die durch elektrostatische Wechselwirkungen bestimmt ist.⁵⁹ 1995 wurden die Affinitäten von Neomycin **31**, Streptomycin **32** und Gentamycin **33** zu TAR-RNA mit Hilfe eines Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) untersucht.⁶⁰ Hierbei ist es möglich, die Bindung eines Moleküle an z.B. RNA oder DNA, über die Wanderung in einem Gel zu untersuchen.

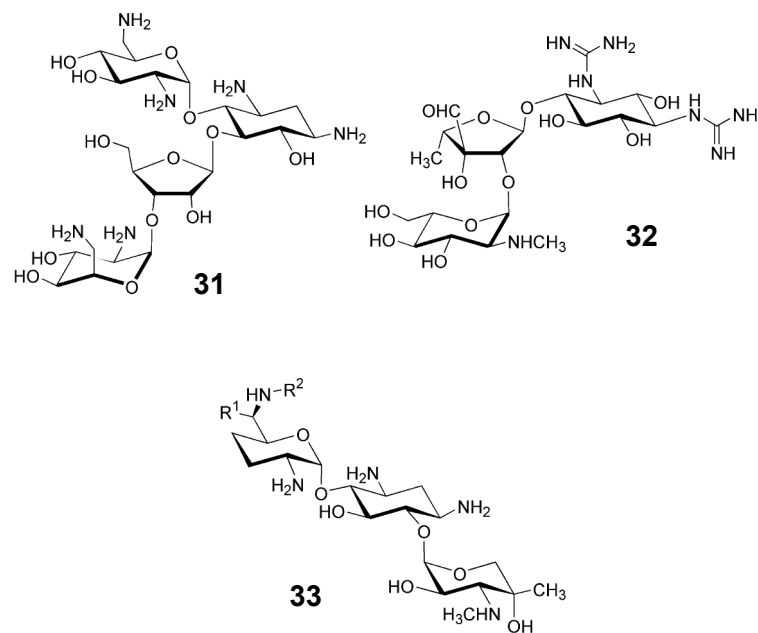


Abbildung 3.14: Aminoglycoside, die an TAR binden

Die IC_{50} -Werte der Bindungen lagen bei Neomycin bei $0.92 \mu\text{M}$, bei Streptomycin bei $9.5 \mu\text{M}$ und bei Gentamycin im Bereich von $45 \mu\text{M}$. Dies zeigt deutlich, dass hier keine Korrelation zwischen der Bindungsaffinität und der Anzahl der positiven Ladungen besteht. So bindet Streptomycin mit einer etwa fünffach höheren Affinität an TAR als Gentamycin, obwohl Streptomycin eine geringere positive Ladung aufweist. Eine Zunahme der Affinität ließ sich dadurch erreichen, dass bei den Aminoglycosiden Kanamycin und Gentamycin C1 Guanidiniumgruppen eingeführt wurden. Diese polykationischen Verbindungen zeigten dann auch eine signifikante biologische Aktivität in Zellkulturen.⁶¹ Die Bindungsstelle von Aminoglycosiden wurde durch footprinting-Experimente bestimmt und zusätzlich unterstützt durch Computerdocking, durchgeführt von Westhof und Hermann, die den Komplex zwischen Neomycin und TAR untersuchten.⁶² Die Computermodelle zeigten, dass sich die Bindungsstellen von tat und Neomycin unterschieden. Dies steht im Einklang mit biochemischen⁶³ und NMR-spektroskopischen Daten.⁶⁴

3.4.3 Small Molecules

In den letzten zehn Jahren wurden nur relativ wenige nichtpeptidische Liganden für die TAR-RNA beschrieben. Abbildung 3.15 zeigt die bekanntesten Strukturen.

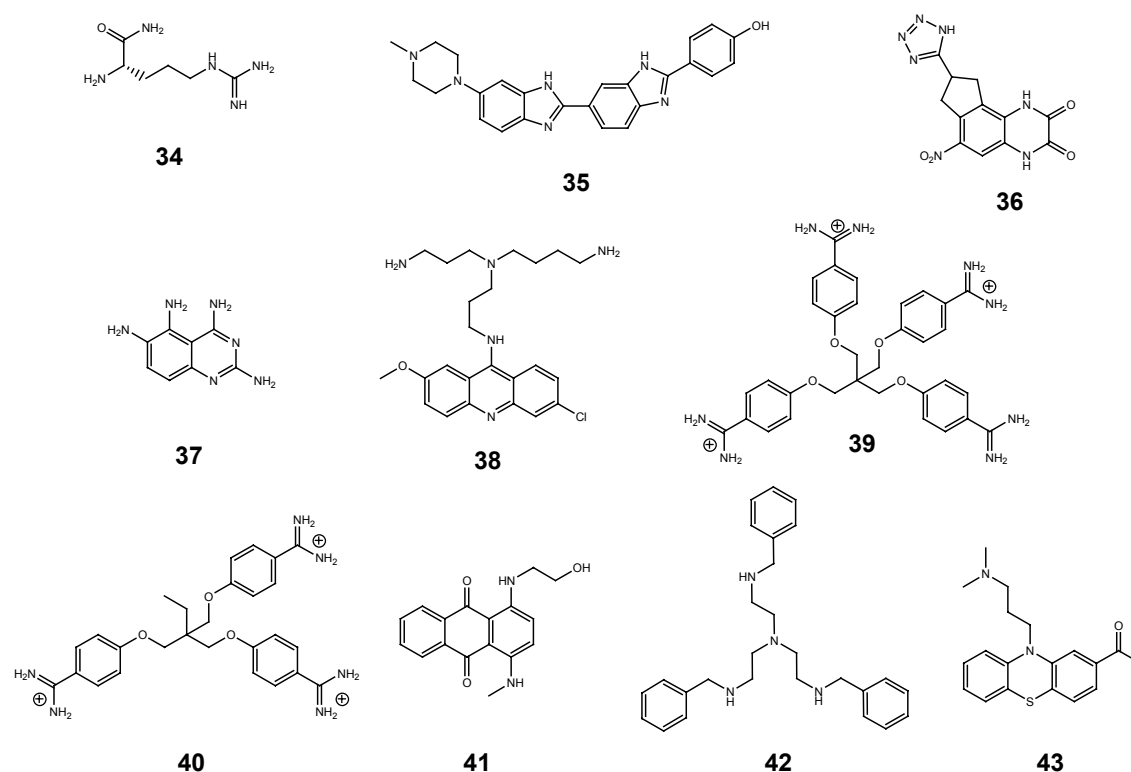


Abbildung 3.15: Strukturen von small molecules die an TAR binden

Die ersten beschriebenen Beispiele hierfür waren Benzodiazepine und Steroide.⁶⁵ Deren Inhibierung der Virusreplikation beruhte jedoch nicht auf der Bindung an TAR, sondern vielmehr auf der Bindung an das tat-Protein.⁶⁶ 1996 untersuchte Bailly die TAR-Bindung von Hoechst 33258 **35** mit Hilfe von Circular Dichroismus und nachfolgenden footprinting-Experimenten.⁶⁷ Dabei wurde eine Interkalation im bulge Bereich identifiziert. Im selben Jahr entwickelte die Gruppe um Mei ein Hochdurchsatz-Screening, um Moleküle zu finden, die die tat-TAR Wechselwirkung inhibieren sollten.⁶⁸ Ausgehend von

150.000 Strukturen gelang ihnen die Identifizierung von zwei vielversprechenden Kandidaten, dem Quinoxalin **36** und dem Tetraaminoquinoxalin **37**. Es ist besonders erwähnenswert, dass beide Verbindungen strukturell weder mit Interkalatoren, noch mit Aminoglycosiden verwandt sind. Verbindung **36** bindet in der bulge Region, während **37** dies am 3'-Ende des loops tut (Abb. 3.17). Unabhängig davon synthetisierte Hamy die bereits erwähnten Acridinderivate. Die aktivste Verbindung aus dieser Serie war CGP 40336A **38**, die mit einem IC_{50} -Wert von 22 nM *in vitro* und einem IC_{50} -Wert von 1.2 μ M in einem Zellassay die bis heute höchste Affinität zu TAR zeigt. Footprinting und Schmelzpunkt-Experimente zeigen eine Wechselwirkung von **38** mit dem G26:C39 Basenpaar und eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Acridin-NH und N7 des Guanins. Eine weitere Wasserstoffbrücke wird zwischen der Methoxygruppe und der Aminogruppe des Cytosins gebildet.

Aromatische Polyamine wie TAPP **39** und TAPB **40** stellen einen anderen Strukturtyp von Verbindungen dar, die die tat-TAR Wechselwirkung stören.⁶⁹ In einem Zellkulturassay zeigten, dass **39** und **40** die Virusreplikation bei Konzentrationen von 18 bzw. 22 μ M inhibieren konnten.

Eine inzwischen etablierte Methode zum Auffinden von RNA-Liganden ist die computerbasierte Struktursuche.⁷⁰ 2000 berichtete James von einem virtuellen Screening nach TAR-Liganden. Ausgehend von 153.000 Strukturen wurden 350 Verbindungen gefunden, von denen vermutet wurde, dass sie hohe Affinitäten zeigen würden. Interessanterweise wurden viele Strukturen gefunden, die auf den ersten Blick nicht als Liganden in Betracht gezogen würden. Zwei von ihnen (Verbindung **41** und **42**) zeigten IC_{50} -Werte von ungefähr 1 μ M. Später identifizierte James nach der gleichen Methode Acetylpromazin **43** als TAR-Ligand.⁷¹ Die Bindungskonstante von Acetylpromazin lag bei 270 μ M (NMR-Studien). Spätere Untersuchungen mit zusätzlichen RNA-Strukturen wie z.B. der ribosomalen A-site und dem Cocksackie Virus B3 Loop D zeigten jedoch vergleichbare Bindungskonstanten, so dass nur von einer begrenzten Selektivität gegenüber RNA ausgegangen werden kann.⁷² Ein weiterer vielversprechender TAR-Ligand ist die Verbindungen rbt550 **44** (Abb. 3.16) mit nanomolarer Affinität. Der durch NMR,

theoretische Strukturanalyse und Fluoreszenz-Assay identifizierte Ligand zeigte im zellulären Test einen IC₅₀-Wert im mikromolaren Bereich.⁷³

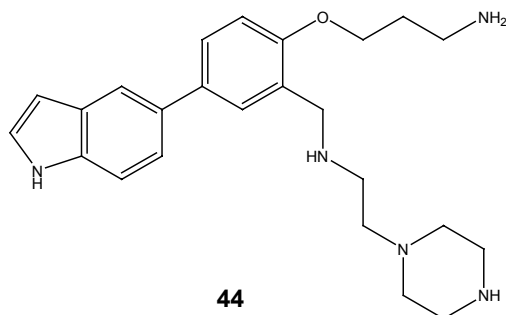


Abbildung 3.16: Struktur von *rbt550* 44

Abbildung 3.17 fasst verschiedene Liganden und ihre Bindungsstelle an TAR zusammen.

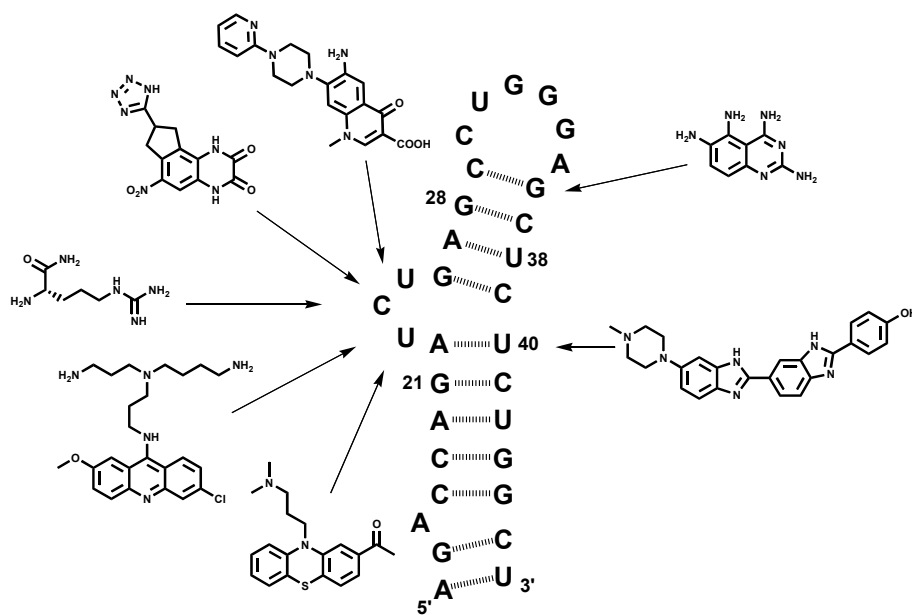


Abbildung 3.17: Bindungsstellen verschiedener TAR Liganden

ebenfalls Peptidanalogue, basierend auf Carbamaten und Harnstoffen (Abb. 3.19).⁷⁶

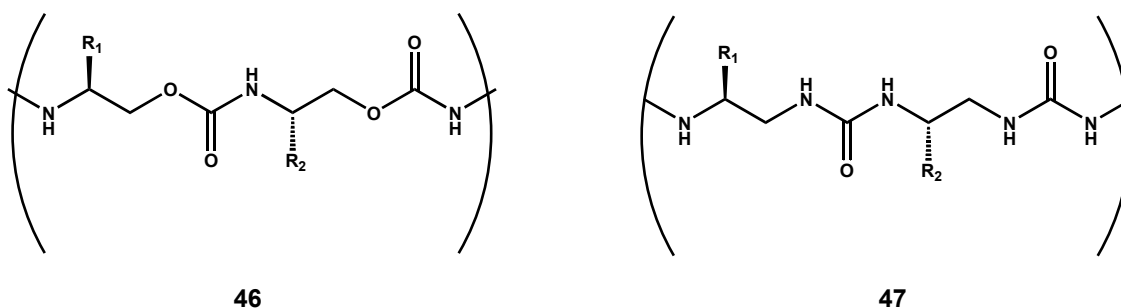


Abbildung 3.19: Strukturen der Oligoharnstoff- und Oligocarbamat-Derivate

Die Sequenz dieser Derivate basiert auf der basischen Region von tat. EMSA Experimente zeigen für die Harnstoffderivate eine höhere Affinität ($K_D = 0.11 \mu\text{M}$) als für die entsprechenden Carbamate ($K_D = 1.1 \mu\text{M}$) und das natürliche L-tat-Peptid ($K_D = 0.78 \mu\text{M}$). Um einen Abbau der Verbindungen durch Proteasen zu verhindern, wurden dann Oligopeptide mit Ester- und Amid-Gruppen hergestellt und auf ihre Anti-HIV-Aktivität hin getestet.⁷⁷ Das Ester-Peptoid-Derivat **48**, welches das Strukturmotiv von Tat (47-57) aufwies, zeigte mit einem K_D -Wert von $0.068 \mu\text{M}$ (Fluoreszenz-Quenching) eine leicht höhere Affinität als das entsprechende Amid-Peptoid **49** (Abb. 3.20).

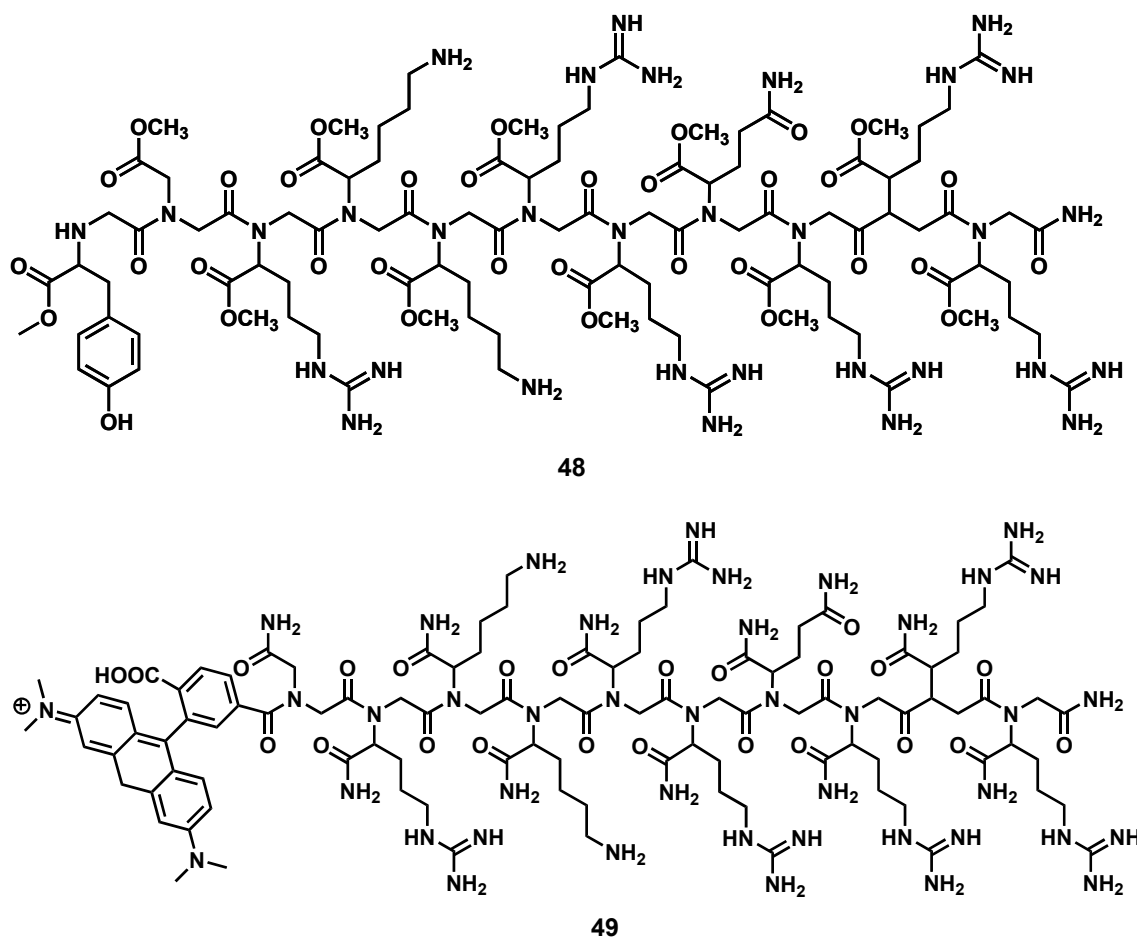


Abbildung 3.20: TAR bindende Peptidanaloga **48** und **49**

Um herauszufinden, ob nicht auch kürzere Peptide, die sich nicht von tat ableiten, als TAR-Liganden agieren, wurde eine kombinatorische Bibliothek aus 24.389 Tripeptiden hergestellt.⁷⁸ Diese bestand aus D- und L-konfigurierten Standard-Aminosäuren. Aus dieser Bibliothek erwiesen sich acht Tripeptidsequenzen als vielversprechend. Hierbei konnte ein bevorzugtes Strukturmotiv mit dem Motiv X-Lys-Asn gefunden werden. Die besten Binder waren NH₂-(L)Lys-(D)Lys-(L)-Asn-OH **50** (K_D= 0.42 μM) und NH₂-(D)Thr-(D)-Lys-(L)-Asn-OH (K_D=0.56 μM). Alle weiteren Peptide waren Diastereomere des NH₂-Lys-Lys-Asn-OH und zeigten deutlich schlechtere Ergebnisse. Der Einfluss stereoselektiver Effekte bei der Wechselwirkung mit der RNA konnte damit bestätigt werden. Um die biologische Aktivität von **50** zu verbessern, wurde dieses Strukturmotiv in eine cyclische Peptidstruktur eingebunden (**51** in Abb. 3.21). Hierbei konnte jedoch keine signifikante Erhöhung festgestellt werden.⁷⁹

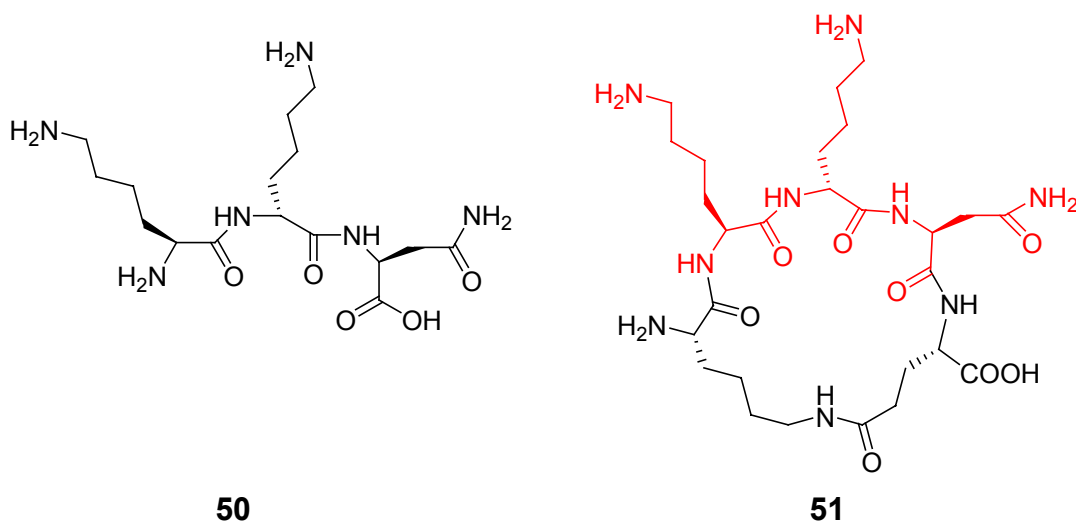


Abbildung 3.21: Struktur von **50** und **51**

In einer zweiten kombinatorischen Synthese wurde aus derselben Arbeitsgruppe eine 39.304 Moleküle umfassende kombinatorische Bibliothek vorgestellt.⁸⁰ Ein Screening lieferte aus dieser Bibliothek 59 potentielle TAR-Liganden. Durch Struktur-Aktivitäts-Bestimmungen konnten 19 Verbindungen identifiziert werden, die eine hohe TAR-Affinität zeigten ($K_D < 200$ nM). Mit einem TAR-Binder **52** (Abb. 3.22) konnte in einem Zellassay über einen Zeitraum von 24 Tagen eine Unterdrückung der HIV-Replikation mit einer Konzentration von 5 μ M erzielt werden.

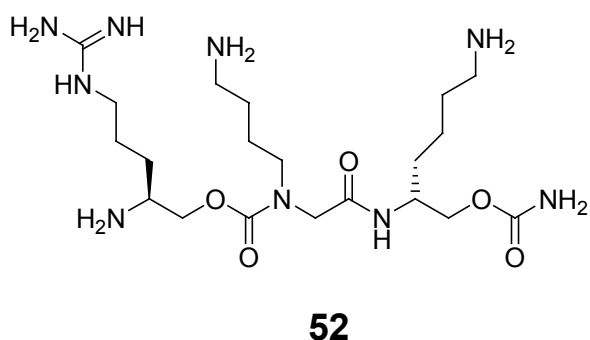


Abbildung 3.22: Struktur von **52**

4 Eigene synthetische Arbeiten

4.1 Eigenschaften von Pyrazol

Pyrazol **53** ist ein Konstitutionsisomer des Imidazols **54** und enthält wie dieses ein pyrrolartiges und ein pyrimidinartiges N-Atom, allerdings in 1,2-Position. Somit existiert im Molekül eine N-N-Bindung.

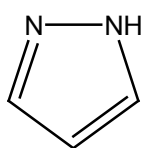
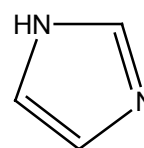
**53****54**

Abbildung 4.1: Pyrazol **53** und Imidazol **54**

Pyrazol ist wie sein Konstitutionsisomer Imidazol aromatisch. Es liegt als π -Überschuß-Heterocyclus vor. Elektrophile Substitutionsreaktionen erfolgen bevorzugt an 4-Position, während der Angriff von Nucleophilen in 3- oder 5-Position erfolgen sollte. Pyrazol liegt im festen Zustand und in konzentrierten Lösungen als Dimer mit zwei intermolekularen Wasserstoffbrücken-Bindungen vor.

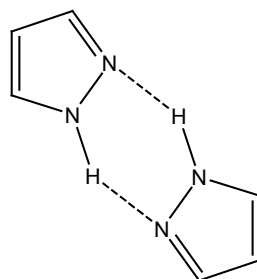


Abbildung 4.2: Dimer des Pyrazols

Säure-Base-Reaktionen

Pyrazole sind wesentlich schwächere Basen als Imidazole, können aber als Pikrate gefällt werden.

Der pK_a -Wert der konjugierten Säure des Pyrazols beträgt 2.52. Die in 1-Position unsubstituierten Pyrazole sind N-H-acide. Der pK_a -Wert des Pyrazols beträgt 14.21 und gleicht somit dem des Imidazols mit 14.52.

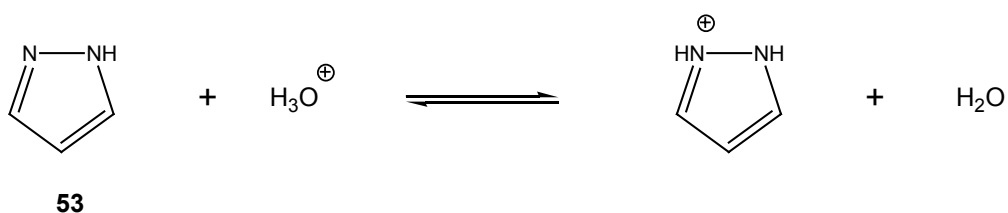


Abbildung 4.3: Säure-Base-Reaktion des Pyrazols

Annulare Tautomerie

In 1-Position unsubstituierte Pyrazole unterliegen einer annularen Tautomerie, deren Gleichgewicht in Lösung sich sehr schnell einstellt.

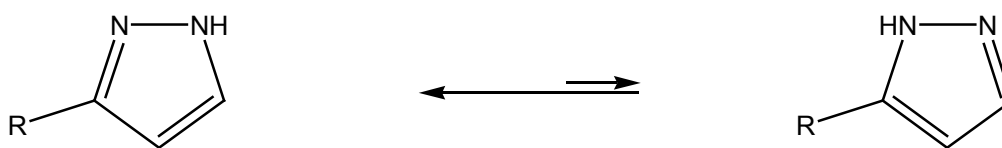


Abbildung 4.4: Annulare Tautomerie des Pyrazols

Die Existenz dieser Tautomere ist nur mit Hilfe von ^{13}C - und ^{15}N -NMR-Spektroskopie nachweisbar. Außer bei $R = Me$ liegt das Gleichgewicht auf der linken Seite, d.h. das 3-substituierte Isomer überwiegt.

4.2 Synthese von Pyrazol

Es existieren zahlreiche Synthesen für Pyrazole⁸¹, von denen zwei durch ihre Variationsfähigkeit und breite Anwendbarkeit hervorzuheben sind. Zum einen erfolgt die Synthese der Pyrazole über Cyclokondensationen von 1,3-Dicarbonylverbindungen mit Hydrazin, Alkyl- oder Arylhydrazinen.

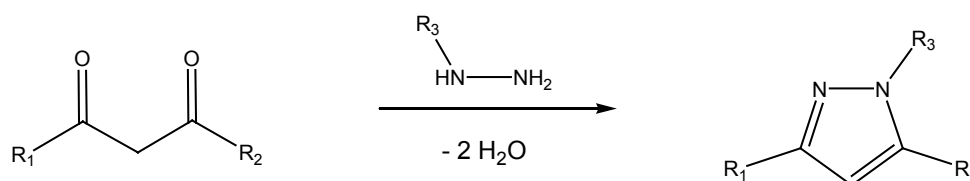


Abbildung 4.5: Cyclokondensation zu Pyrazolen

Hierbei ergeben unsymmetrische 1,3-Diketone Gemische der Konstitutionsisomere. Der Mechanismus der Reaktion hängt stark von der Art der Substituenten R sowie vom pH-Wert des Reaktionsmediums ab. Bei einer Variante dieser Reaktion werden Alkynylketone als bifunktionelle Komponente eingesetzt.⁸²

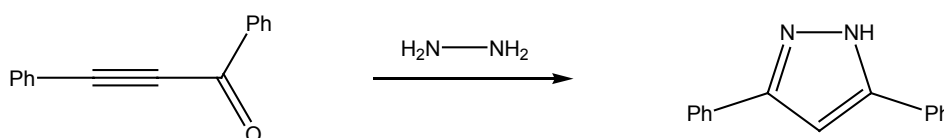


Abbildung 4.6: Synthese von 3,5-Diphenylpyrazol⁸²

Die zweite oft verwendete Synthesemöglichkeit ist die 1,3-dipolare Cycloaddition an Alkine (Abb. 4.7).⁸³

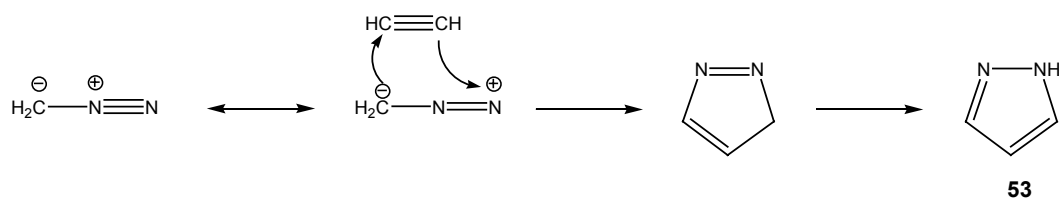


Abbildung 4.7: Reaktion von Acetylen mit Diazomethan zu Pyrazol⁸³

Diazomethan reagiert mit Acetylen im Rahmen einer konzertierten [3+2] Cycloaddition zunächst zum 3*H*-Pyrazol, welches schnell zu Pyrazol isomerisiert.

Naturstoffe, die einen Pyrazolring enthalten, sind sehr selten. Es gibt offenbar kaum Enzyme, die in der Lage sind, N-N-Bindungen aufzubauen. Jedoch sind viele synthetisch hergestellte Pyrazole biologisch aktiv. Einige werden als Pharmaka eingesetzt, wie z.B. das analgetisch entzündungshemmende und fiebersenkende Difenamizol **55** oder das zu Histamin biostere Betazol **56**, das selektiv den H_2 -Rezeptor blockiert.

Auch finden Pyrazole ihre Verwendung als Herbizide (Difenzoquat **57**) und Insecticide (Dimetilan **58**)

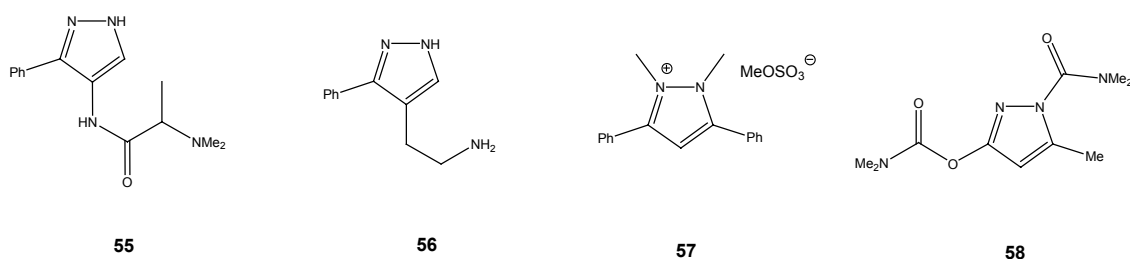
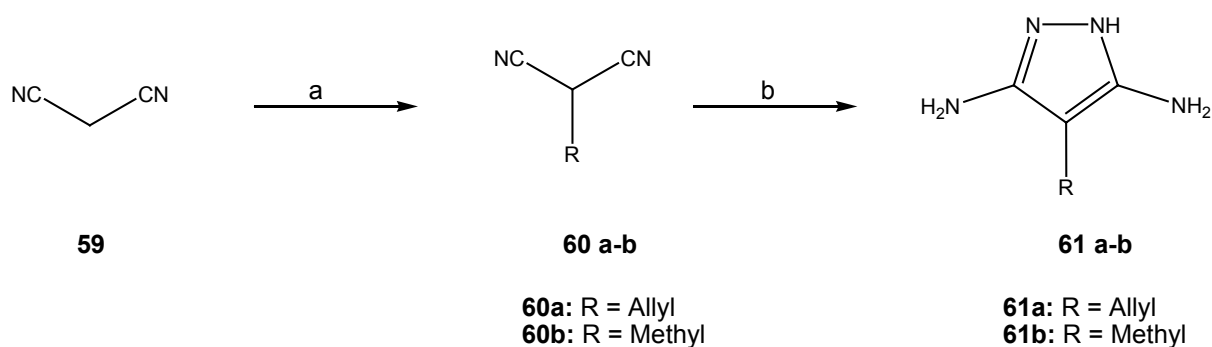


Abbildung 4.8: Difenamizol **55**, Betazol **56**, Difenzoquat **57** und Dimetilan **58**

4.3 Synthese der 3,5-Diaminopyrazole

4.3.1 Synthese von 4-alkylsubstituierten Diaminopyrazolen

Basierend auf dem vermuteten Bindungsschema der Diaminopyrazole an TAR (Kapitel 1) wurden zu Beginn der Arbeit in 4-Position alkylsubstituierte 3,5-Diaminopyrazole synthetisiert.⁸⁴



(a) TBAI oder TBAB, K_2CO_3 , R-Br; (b) Hydrazin, EtOH

Abbildung 4.9: Synthese von in 4-Position substituierten Diaminopyrazolen

Die Synthesestrategie ging von Malonsäuredinitril **59** aus, welches in 2-Position alkyliert wurde. Daraufhin erfolgte eine Reaktion mit Hydrazinhydrat zu den erwünschten Produkten in guten bis mäßigen Ausbeuten. Die Aufarbeitung der jeweiligen Diaminopyrazolderivate erwies sich als relativ schwierig. Säulenchromatographische Aufreinigung führte auch nach mehrmaliger Wiederholungen nicht zu reinen Produkten. Man erhielt jedoch durch einfache Kokristallisation mit Pikrinsäure aus dem Rohprodukt die entsprechenden Derivate elementaranalysenrein.

4.3.2 Synthese von 4-unsubstituierten Diaminopyrazolen

Die Synthese von in 4-Position unsubstituierten Diaminopyrazolen gelingt auf dem oben beschriebenen Weg nicht. Versuche, sie auf diesem Weg zu erhalten, führten zu Verbindung **62**.⁸⁵

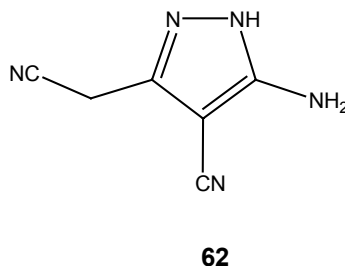
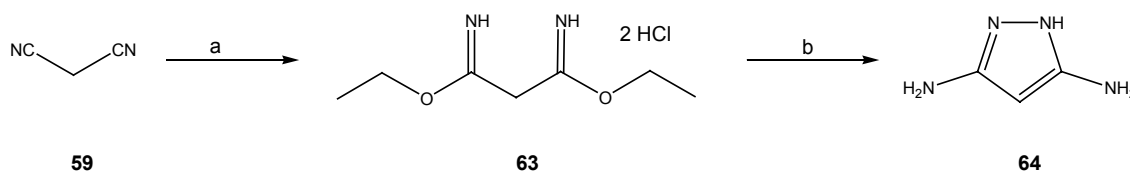


Abbildung 4.10: Reaktionsprodukt von Hydrazin mit Malonsäuredinitril **59**⁸⁵

Die Autoren erklären diesen Befund mit der Dimerisierung von Malonsäuredinitril und anschließender Reaktion mit Hydrazin.

Die Synthese muss daher abgewandelt werden (Abb. 4.11).⁸⁶



(a) EtOH, HCl; (b) Hydrazin

Abbildung 4.11: Synthese von 3,5-Diaminopyrazol⁸⁶

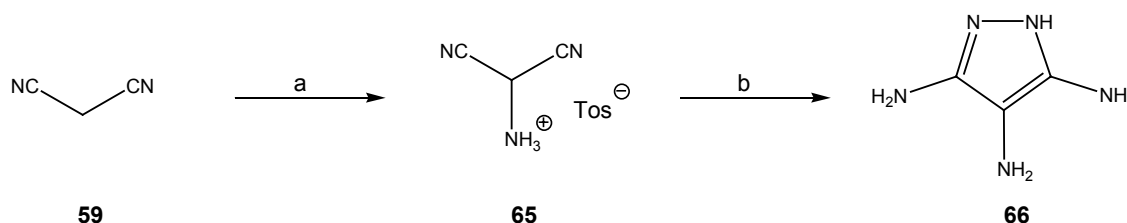
Wiederum ausgehend von Malonsäuredinitril **59** wird zunächst mit Ethanol und HCl-Gas das Hydrochlorid des Diethylmalonimidats **63** hergestellt. Dies gelingt mit quantitativer Ausbeute. Anschließende Reaktion mit Hydrazin in siedendem Ethanol ergibt Diaminopyrazol mit 89 % Ausbeute.

4.4 Synthese von Triaminopyrazol

Da, wie später in Kapitel 6 beschrieben, der pK_a -Wert der in 4-Position alkylierten 3,5-Diaminopyrazole mit etwa 5.3 zu niedrig ist, als dass sie bei physiologischen Bedingungen protoniert vorliegen könnten, wurde entschieden, in 4-Position einen Elektronendonator einzuführen, um den pK_a -Wert zu erhöhen. Für einen geeigneten Elektronendonator wurde eine weitere Aminogruppe in Betracht gezogen. Ein Syntheseweg für ein solches Triaminopyrazol würde zudem die Einführung verschiedener Reste mit Aminofunktionen zulassen.

4.4.1 Versuche zur Synthese über Aminomalonsäuredinitril

Als erste Synthesestrategie wurde versucht, ausgehend von Aminomalonsäuredinitril, durch Cyclisierung mit Hydrazin zu **66** zu gelangen (Abb. 4.12).



(a) NaNO_2 , Hg/Al , $p\text{-Tos}$; (b) Hydrazin

Abbildung 4.12: Erster Syntheserversuch für Triaminopyrazol

Die Einführung der Aminofunktion in Malonsäuredinitril erfolgte über zwei Reaktionsschritte in einem Eintopfverfahren. Zuerst wurde mittels NaNO_2 eine Nitrosogruppe eingeführt, die anschließend in situ mit Hg/Al reduziert wurde. Da sich **65** an der Luft schnell zersetzt, muss es als Tosylatsalz isoliert werden, welches auch nach mehreren Monaten Lagerung noch stabil ist. Die anschließende Cyclisierung mit Hydrazin zu **66** erfolgte unter verschiedenen Bedingungen. So wurde versucht, die Reaktion sowohl mit dem Salz als auch

mit der freien Base durchzuführen. Dabei wurden Reaktionstemperaturen von – 20–100 °C und verschiedene Lösungsmittel getestet. Es gelang jedoch nicht, **66** als Reinsubstanz zu isolieren. Massenspektroskopische Untersuchungen zeigten zwar die Entstehung von Triaminopyrazol, allerdings wurden weitere Massensignale gefunden, die nicht weiter zugeordnet werden konnten.

In einem weiteren Versuch sollte **65** durch eine Pinner-Reaktion zum Imidat **67** umgesetzt werden (Abb. 4.13) und anschließend durch eine Cyclisierung zu Triaminopyrazol umgesetzt werden.

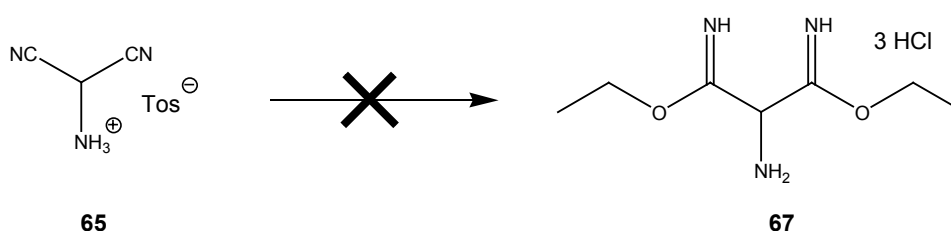
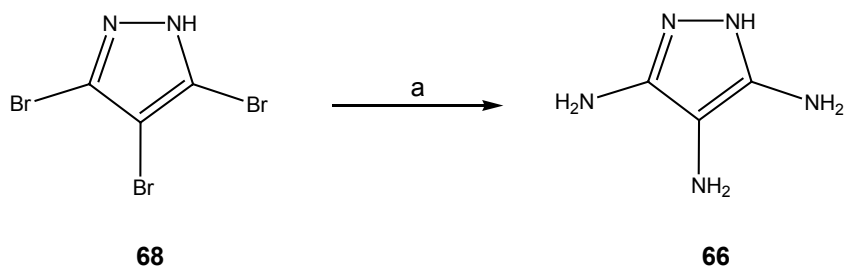


Abbildung 4.13: Versuch der Umsetzung von **65** durch eine Pinner-Reaktion

Jedoch gelang es nicht, bei dieser Reaktion das gewünschte Produkt zu isolieren.

4.4.2 Synthese von Triaminopyrazol über Aminierung von Tribrompyrazol

Da der oben beschriebene Syntheseweg nicht zum Ziel führte, wurde nun versucht, das gewünschte Zielmolekül über die Aminierung von Tribrompyrazol **68** zu erhalten (Abb. 4.14).



(a) NH₃ (l), CuCl, CuSO₄ oder Cu₂O

Abbildung 4.14: Aminierung von Tribrompyrazol **68**

Während der Austausch eines oder zweier Bromatome durch Aminofunktionen bei relativ milden Reaktionsbedingungen wie wässrige Ammoniaklösung und milden Temperaturen möglich ist, erfordert die Einführung einer dritten Aminogruppe durch die vorherige Erhöhung der Elektronendichte im Aromaten drastischere Bedingungen. Daher wurden hierfür verschiedene Reaktionsbedingungen getestet. Tabelle 4.1 zeigt die Ausbeuten bei Verwendung verschiedener Lösungsmittel, Reaktionstemperaturen und Katalysatoren. Es zeigte sich, dass gute Ausbeuten nur bei flüssigem Ammoniak unter höheren Drücken ab 40 bar zu erhalten waren. Die Zugabe von 30 mol-% Kupfer(I)-Salzen ist nötig, wobei das jeweilige Gegenion keinen Einfluss auf die Ausbeute hat.

Tabelle 4.1: Versuche zur Synthese von Triaminopyrazol aus Tribrompyrazol **68**

Katalysator (30 mol-%)	Lösungsmittel	Temperatur [°C]	Druck [bar]	Ausbeute [%]
CuCl	wäss. NH ₃ (25 %)	90	1	0
CuCl	EtOH/NH ₃	60	5	10
CuO ₂	EtOH/NH ₃	60	5	11
CuSO ₄	EtOH/NH ₃	60	5	9
CuO ₂	MeOH/NH ₃	50	10	27
CuSO ₄	MeOH/NH ₃	50	10	30
CuCl	MeOH/NH ₃	50	10	33
CuO ₂	NH ₃	80	45	89
CuSO ₄	NH ₃	80	45	92
CuCl	NH ₃	80	45	94
CuSO ₄	NH ₃	80	55	91

Abbildung 4.15 zeigt ein typisches ¹H-NMR-Spektrum nach Isolierung des Reaktionsproduktes als Hydrochlorid. Die Aufspaltung der Signale der Aminogruppen zwischen 7 und 8 ppm ist wahrscheinlich durch eine eingeschränkte Rotation zu erklären, aufgrund derer die Protonen nicht mehr chemisch äquivalent sind.

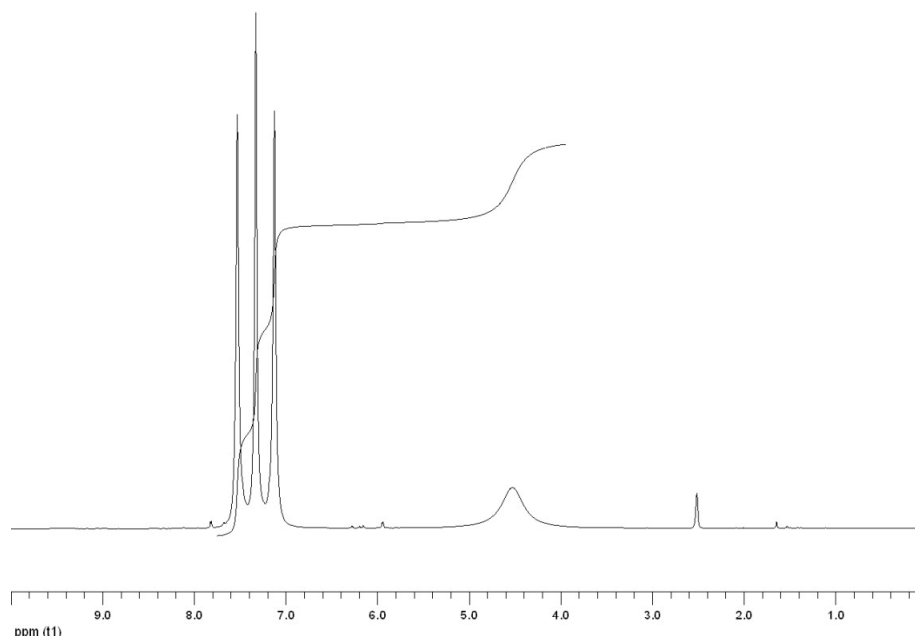


Abbildung 4.15: ^1H -NMR-Spektrum von Triaminopyrazol **66** als Hydrochlorid

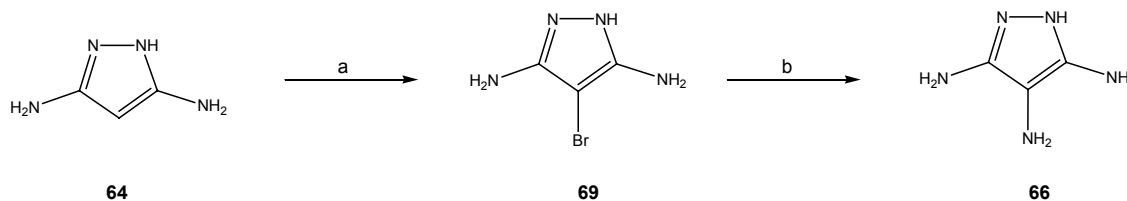
Allerdings zeigten die Elementaranalysen der isolierten Produkte dieser Reaktionsansätze nicht annähernd korrekte Werte. Es wurde daher vermutet, dass die jeweiligen Verbindungen mit anorganischen Salzen verunreinigt waren. Eine Erklärung hierfür findet sich in Kapitel 4.4.6.1.

Versuche der Aufreinigung durch Ausfällen des Triaminopyrazols mit verschiedenen Gegenionen, wie Pikrinsäure, HCl, H_2SO_4 , Toluolsulfonsäure oder Oxalsäure, blieben erfolglos. Daher wurde versucht, eine alternative Syntheseroute zu wählen.

4.4.3 Versuch der Synthese von Triaminopyrazol durch Reaktion von 3,5-Diamino-4-brompyrazol mit Ammoniak

Ausgehend von 3,5-Diaminopyrazol wurde versucht, durch Bromierung und anschließende Reaktion mit Ammoniak zu Triaminopyrazol **66** zu gelangen.

Hierzu wurde **64** mit Br₂ bromiert (Abb. 4.16). Anschließende Reaktion von **69** mit NH₃ sollte das gewünschte Produkt liefern.



(a) Br₂; (b) NH₃

Abbildung 4.16: Versuch zur Synthese von Triaminopyrazol **66**

Hierzu wurden verschiedene Reaktionsbedingungen getestet, die jedoch nicht zum gewünschten Umsatz führten.

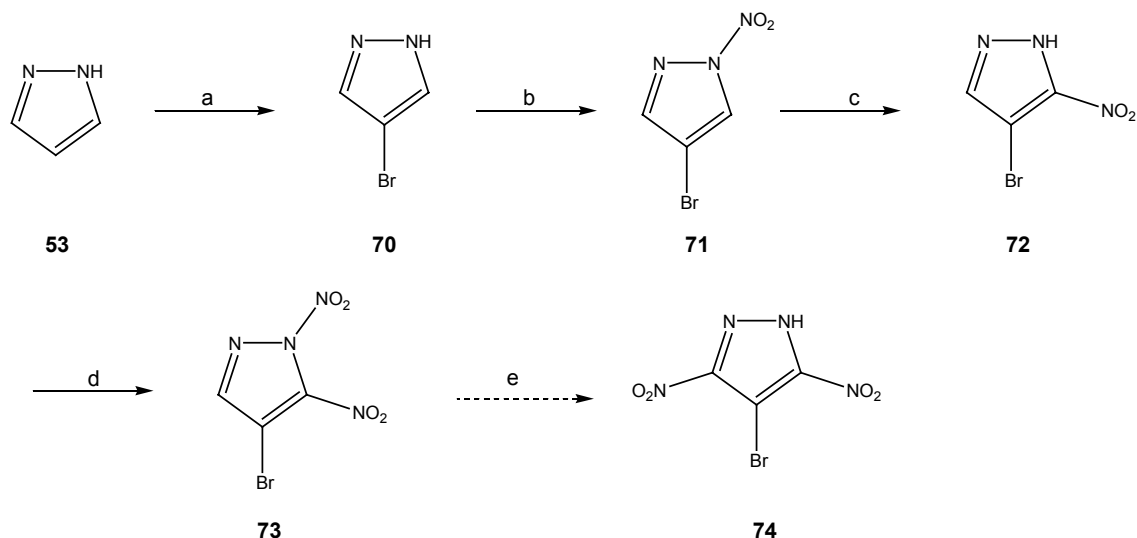
Tabelle 4.2: Versuche zur Synthese von Triaminopyrazol **66** aus 3,5-Diamino-4-brompyrazol **69**

Katalysator	Lösungsmittel	Temperatur [°C]	Druck [bar]	Ausbeute [%]
-	MeOH/NH ₃	25	1	0
CuCl (10 mol-%)	MeOH/NH ₃	40	1	0
CuCl (10 mol-%)	NH ₃	60	30	0
CuCl (30 mol-%)	NH ₃	80	40	0

4.4.4 Versuch der Synthese von Triaminopyrazol über die Synthese von 4-Brom-3,5-dinitro-1H-pyrazol **74**

Als nächster Schritt wurde 4-Brom-3,5-dinitro-1H-pyrazol **74** als mögliches Ausgangsprodukt für die Synthese von Triaminopyrazol in Betracht gezogen. Die direkte Nitrierung von Pyrazol durch HNO₃/H₂SO₄ führt ausschließlich zu 4-Nitropyrazol. Es ist dann nicht mehr möglich, eine weitere Nitrogruppe

einzuführen⁸⁷. Daher wurde in Abwandlung einer literaturbekannten Synthese versucht, über eine wiederholte N-Nitrierung, gefolgt von thermischen Umlagerungen zum Ziel zu gelangen (Abb. 4.17).



(a) Br₂; (b) Ac₂O, HNO₃; (c) Benzonitril, 190 °C; (d) Ac₂O, HNO₃; (e) Benzonitril, 190 °C

Abbildung 4.17: Versuch zur Synthese von 4-Brom-3,5-dinitro-1H-pyrazol **74**

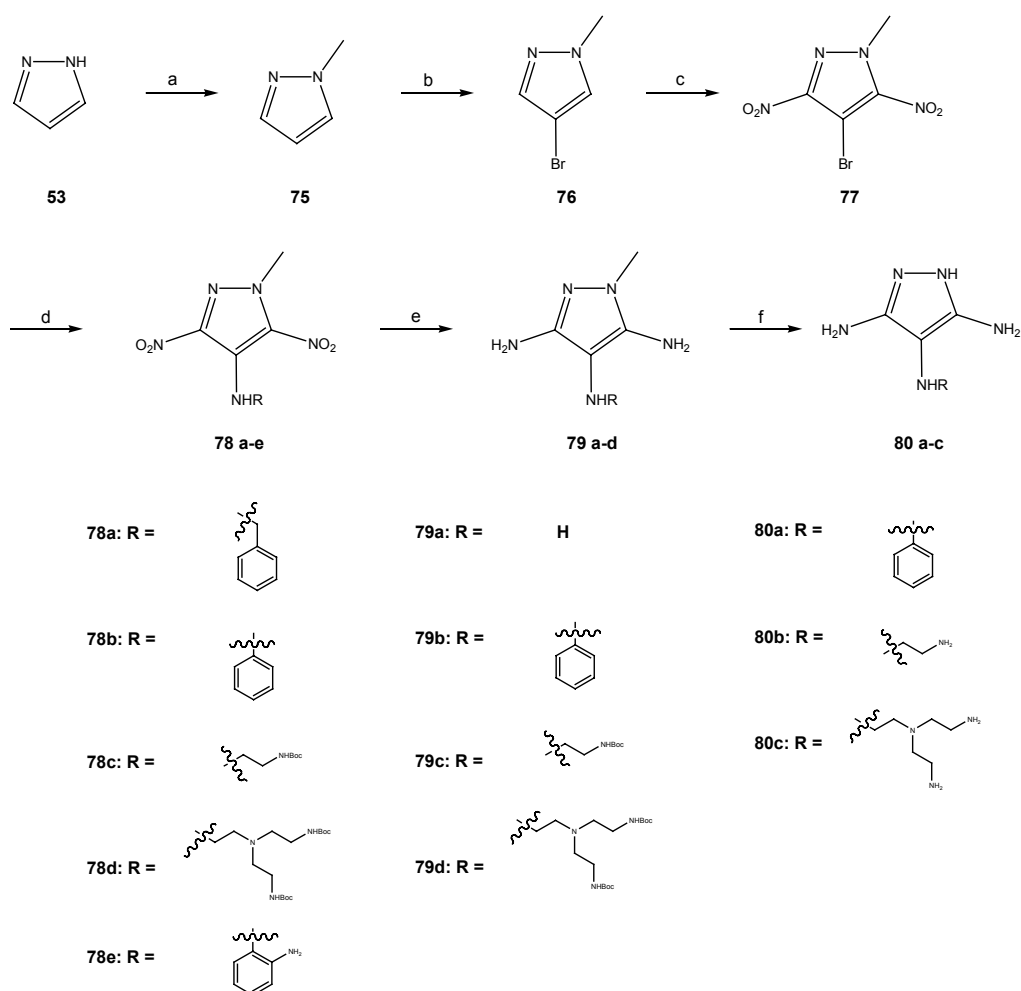
Hierzu wurde Pyrazol in 4-Position bromiert und anschließend, mit in situ gebildetem Acetylnitrat aus der Reaktion von Essigsäureanhydrid und Salpetersäure, selektiv N-nitriert. Dies gelang in sehr guten Ausbeuten von 91 bzw. 98 %. Durch eine thermische Umlagerung in Benzonitril als inertem, hochsiedendem Lösungsmittel erhielt man 4-Brom-3(5)-nitropyrazol **72**. Durch eine erneute N-Nitrierung erhielt man dann Verbindung **73** in ebenfalls sehr guter Ausbeute von bis zu 99 %.

Der letzte Schritt dieses Synthesewegs schlug jedoch fehl. Bei der zweiten thermischen Umlagerung reagierte das Edukt zu einem Produktgemisch aus sechzehn verschiedenen Verbindungen. Eine HPLC-Aufreinigung einiger dieser Produkte mit anschließender Massenanalyse zeigte, dass sich in der Hauptsache Produkte bildeten, die Nitrogruppen eliminiert hatten, wie z.B. 4-Brompyrazol, sowie Produkte, die durch weitere Bromatome substituiert wurden, wie z.B. Dibromnitropyrazol und Tribrompyrazol **68**.

Änderungen in den Reaktionsparametern, wie Reaktionslänge und –temperatur, oder die Verwendung anderer Lösungsmittel, führten zu keinem Erfolg.

4.4.5 Synthese von Triaminopyrazolen über 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitropyrazol 77

Da die zuvor beschriebenen Syntheseveruche fehlschlagen, wurde nun versucht, das Ziel auf einem längeren und zum Teil literaturbekannten Weg zu erreichen. Abbildung 4.18 zeigt diese Synthese ausgehend von Pyrazol.

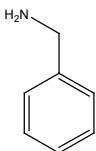
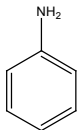
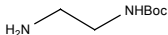
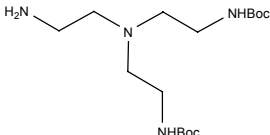
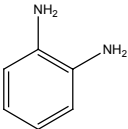


(a) K_2CO_3 , MeI; (b) Br_2 (c) H_2SO_4/HNO_3 ; (d) NHR, DMSO 100 °C; (e) Pd/C, H_2 ; (f) PyHCl, 220 °C

Abbildung 4.18: Synthese von Triaminopyrazol und Derivaten

Da, wie zuvor beschrieben, die direkte Nitrierung von Pyrazol ausschließlich zu 4-Nitropyrazol führt und danach keine weitere Nitrogruppe eingeführt werden kann, ist es nötig, in 4-Position substituiertes Pyrazol als Ausgangsmaterial zu verwenden. Die Einführung von zwei Nitrogruppen in 3- und 5-Position gelang nur, wenn einer der Stickstoffe des Pyrazols methylgeschützt war und somit die Basizität herabgesetzt wurde.⁸⁸ Die Nitrierung von **76** erfolgte in 100-%iger HNO₃ und H₂SO₄ bei 100 °C mit guter Ausbeute. Dieses Zwischenprodukt ließ sich nun mit einer Vielzahl von Aminen zu Verbindungen des Typs **78** kuppeln. Die Umsetzung erfolgte mit einem zwei- bis dreifachen Überschuss an Amin in DMSO bei 100 °C. Die Ausbeuten bewegten sich je nach verwendetem Amin zwischen 46-87% (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Verwendete Amine bei der Kupplung mit **77** sowie die jeweiligen Ausbeuten

Amin	Äquivalente	Ausbeute [%]
	3	76
	3	87
	2	83
	2	46
	3	71

Anschließend wurden die Nitrogruppen mit Wasserstoff und Pd/C zu den entsprechenden Aminen reduziert. Hierfür waren höhere Drücke von bis zu 40 bar und Temperaturen von 60-80 °C nötig. Im nächsten Schritt wurden die Boc-

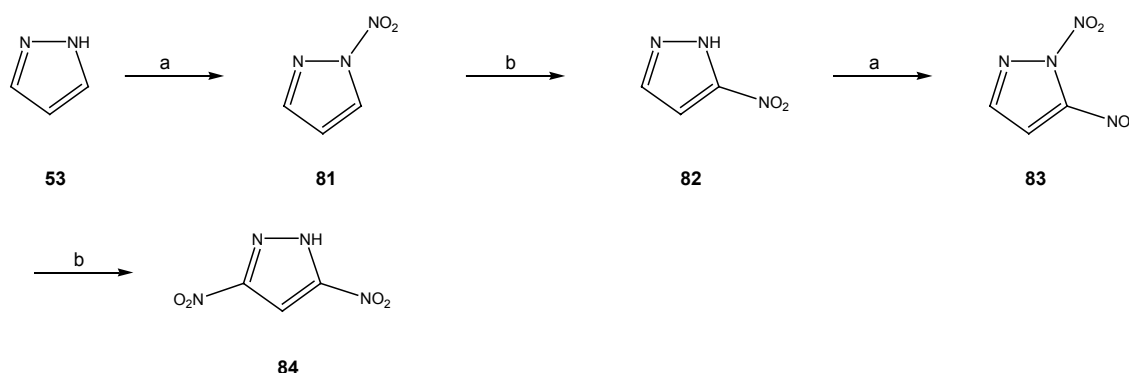
geschützten Verbindungen mit Thionylchlorid entschützt. Man gelangte auf diesem Weg zu verschiedenen Derivaten der Triaminopyrazole, die jedoch noch von der N-Methylgruppe befreit werden mussten. Dies gelang durch die Reaktion mit Pyridiniumhydrochlorid bei 180-220 °C,⁸⁹ allerdings waren die Ausbeuten dieser Reaktionen mit 20-35% nicht sehr befriedigend.

Das Reaktionsprodukt der Demethylierung von **79a** (R = H) zeigte wiederum ein ¹H-NMR-Spektrum, welches identisch war mit dem aus der Reaktion des Tribrompyrazols **68** zu Triaminopyrazol **66** (Abb. 4.14). Ebenso zeigte eine massenspektroskopische Analyse die korrekte Masse an, jedoch lieferte die Elementaranalyse erneut deutlich niedrigere Werte als erwartet. Im Gegensatz hierzu lieferte die Elementaranalyse des Sulfatsalzes von 1-Methyl-triaminopyrazol **79a** (R = H) die korrekten Werte.

Daher wurde versucht, einen weiteren Syntheseweg zu entwickeln, der im nächsten Kapitel dargelegt werden soll.

4.4.6 Synthese von Triaminopyrazol 66 ausgehend von Pyrazol 53

Wie eingangs in Kapitel 4.1 erwähnt, führt die Reaktion von Pyrazol mit Nitriersäure ausschließlich zu 4-Nitropyrazol. Für die Nitrierung in 3(5)-Position, bzw. die Dinitrierung in 3,5-Position musste daher ein synthetischer „Umweg“ gegangen werden (Abb. 4.19).

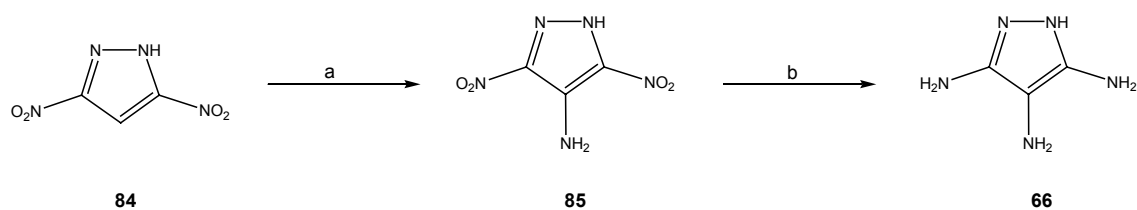


(a), Ac₂O/AcOH/HNO₃; (b) Benzonitril Δ

Abbildung 4.19: Synthese von 3,5-Dinitropyrazol **84**

Zunächst wurde Pyrazol **53** in N-Position nitriert. Dies erfolgte durch die Reaktion mit Acetylnitrat, welches aufgrund seines Explosionspotentials in situ durch die Reaktion von HNO₃ mit Essigsäureanhydrid erzeugt wurde. Diese Reaktion führte mit quantitativer Ausbeute zu **81**. Durch eine thermische Umlagerung in Benzonitril bei 180 °C erhielt man in sehr guter Ausbeute das 3(5)-Nitropyrazol **82**. Durch die Wiederholung der beiden vorangegangenen Schritte gelangte man schließlich zu 3,5-Dinitropyrazol **84**. Die Ausbeuten dieser Reaktionsschritte lagen sämtlich über 95 % und es bedurfte keinerlei säulenchromatographischer Aufreinigungsschritte.

Als nächste Reaktionsschritte schlossen sich die Einführung einer Aminogruppe in 4-Position und anschließende Reduktion zum Triaminopyrazol an (Abb. 4.20).



(a) KOtBu, TMHI **117**; (b) Pd/C, H₂

Abbildung 4.20: Synthese von Triaminopyrazol **66**

Die Einführung der Aminogruppe gelang mit 1,1,1-Trimethylhydrazinium-iodid (TMHI) in sehr guter Ausbeute.⁹⁰ Anschließende Reduktion von **85** mit H₂ und Pd/C zu Triaminopyrazol gelang mit einer Ausbeute von 79 %. Durch mehrmaliges Umkristallisieren des Reaktionsproduktes aus schwefelsaurem Wasser gelang es letztendlich, Kristalle von **66** zu erhalten, so dass die Struktur durch eine Röntgenstrukturanalyse bewiesen werden konnte (Abb. 4.21).

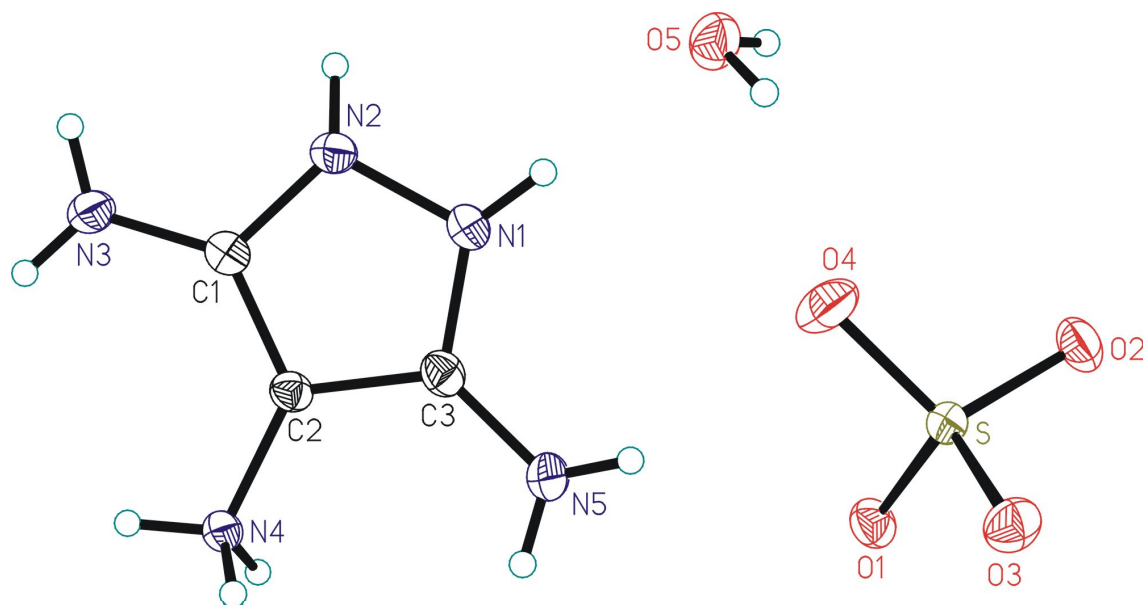


Abbildung 4.21: Röntgenstruktur des Triaminopyrazolsulfat Monohydrats

4.4.6.1 Untersuchungen des chemischen Verhaltens von Triaminopyrazol **66** bei der Verbrenungsanalyse

Überraschenderweise entzog sich auch das Triaminopyrazol, das auf diesem Weg synthetisiert wurde, der Analytik durch eine Elementaranalyse. Auch von diesem Produkt waren, wie in den Ansätzen zuvor, die CHN-Werte deutlich zu niedrig. Da an der Identität der Struktur nun kein Zweifel mehr bestand, wurde versucht, eine Erklärung für diesen offensichtlichen Widerspruch zu finden. Als eine mögliche Erklärung erschien, dass **66** beim Verbrennen drei Äquivalente HCN bildet. Dadurch wäre es möglich, dass sich ein großer Teil des Kohlenstoffs sowie des Stickstoffs der Elementaranalyse entziehen können (Abb. 4.22).

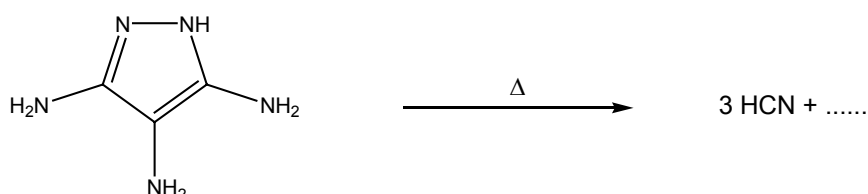
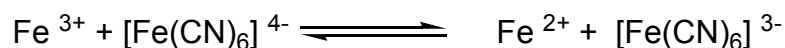
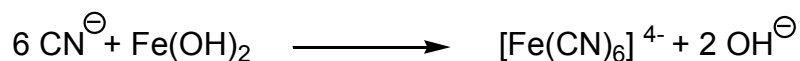


Abbildung 4.22: Mögliche Bildung von HCN bei der Verbrennung von Triaminopyrazol **66**

Um diese Theorie zu bestätigen, wurden einige Milligramm von **66** bei einer Temperatur von etwa 1000 °C verbrannt. Die Verbrennungsgase wurden nach einem Standardverfahren⁹¹ auf das Vorhandensein von Cyanidionen überprüft. Der Nachweis erfolgte als „*Berliner Blau*“. Hierzu wurden die bei der Verbrennung entstandenen Gase in eine 1-%ige alkalische Fe(SO₄)-Lösung geleitet. Dort bildet sich bei Vorhandensein von Cyanidionen *Turnbulls Blau*. Dieses reagiert bei Zugabe von Fe³⁺-Ionen und halbkonzentrierter Salzsäure zu *Berliner Blau*, das dann mit *Turnbulls Blau* im Gleichgewicht liegt. Nachfolgende Reaktionsgleichungen fassen dies zusammen:



Beim Vorhandensein von Cyanidionen entsteht daher, je nach Menge, eine grüne Lösung, aus der sich langsam blaue Flocken abscheiden, oder aber sofort eine tiefblaue Lösung.

Nach dem Durchleiten der Verbrennungsgase durch die Eisensulfatlösung wurde diese angesäuert und zeigte sofort die typische Blaufärbung (C in Abb. 4.13). Zur Kontrolle wurden ebenfalls die Verbrennungsgase von KCN (A) sowie und N-Methyl-triaminopyrazol **79a** (B) auf Cyanidionen analysiert.

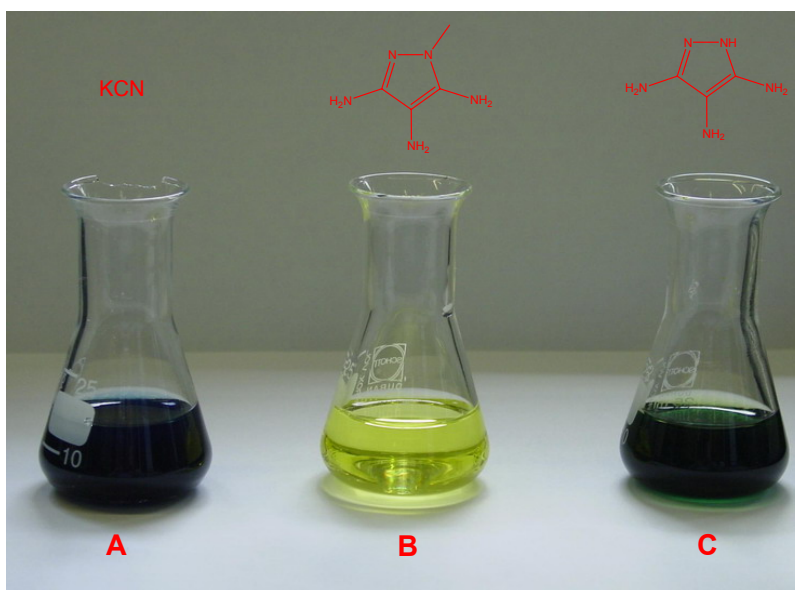


Abbildung 4.23: Berliner-Blau-Nachweis der Verbrennungsgase von (A) KCN, (B) N-Methyl-triaminopyrazol **79a** ($R = H$) und (C) Triaminopyrazol **66**

Diese Ergebnisse untermauern deutlich die Theorie, dass Triaminopyrazol beim Verbrennen Cyanid freisetzt. Dies wäre eine Erklärung für die falschen Ergebnisse bei der Elementaranalyse.

4.4.6.2 Untersuchungen des Oxidationsverhaltens von Triaminopyrazol

Aufgrund der Beobachtung, dass eine Lösung von Triaminopyrazol **66** in Wasser nach längerem stehen lassen (> 48 h) einen Farbumschlag von blassgelb nach rotbraun zeigt, wurde vermutet, dass sich möglicherweise die Oxidationsprodukte **86** und/oder **87** bilden könnten (Abb. 4.24)

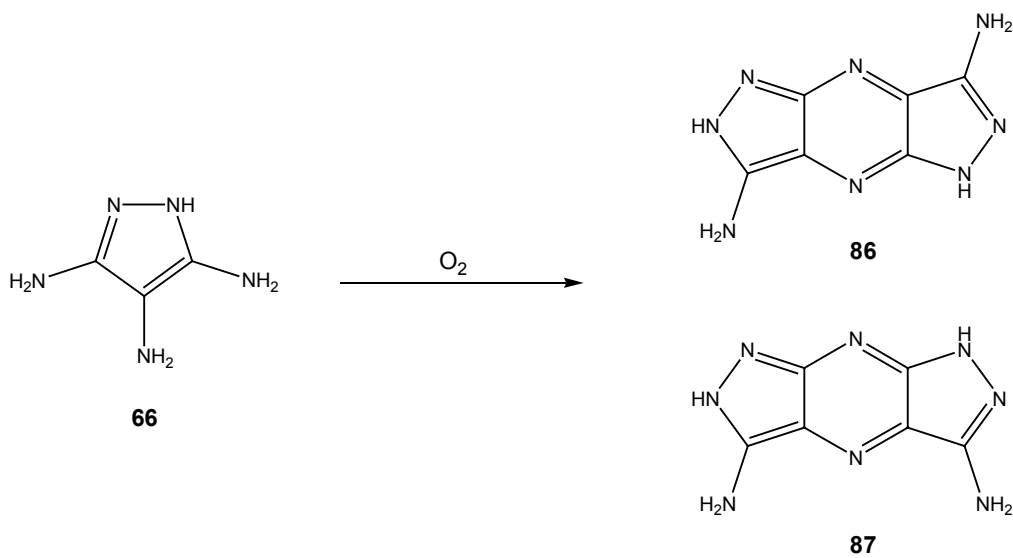


Abbildung 4.24: Mögliche Reaktionsprodukte bei der Luftoxidation von Triaminopyrazol **66**

Diese Art der Oxidation von 1,2-Diaminoaromaten ist literaturbekannt,⁹² vollzieht sich jedoch meistens nur bei sehr hohen pH-Werten. Daher wurde Verbindung **66** in Wasser gelöst und mit NaOH auf einen pH-Wert von 13 gebracht. Die Lösung wurde daraufhin für fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt. Während dieser Zeit wurde ein stetiger Luftstrom durch die Lösung geleitet. Die Analyse der Reaktionsprodukte durch Dünnschichtchromatographie zeigte, neben immer noch vorhandenem Edukt, die Bildung von zwei neuen, unpolareneren Produkten. Nach der Isolation dieser beiden Produkte konnten diese mit Hilfe von NMR- und Massenspektroskopie, den vorgeschlagenen Strukturen **86** und **87** zugeordnet werden. Eine Elementaranalyse des Hauptprodukts zeigte, wie schon zuvor bei Triaminopyrazol **66** deutlich zu niedrige Werte. Daher wurde auch hier ein Nachweis der Verbrennungsgase auf Cyanid durchgeführt (Kapitel 4.4.6.1), der

ebenfalls positiv ausfiel. Offenbar setzt auch diese Verbindung beim Verbrennen Cyanid frei.

Die Wiederholung der Oxidation bei einem pH-Wert von 7.4 zeigte durch eine HPLC-Analyse, dass Triaminopyrazol unter diesen Bedingungen relativ stabil ist. So konnten nach sieben Tagen nur etwa 5% des Oxidationsprodukts nachgewiesen werden.

4.4.7 Synthese von 1-Methyl-1H-pyrazolo[4,3-b]quinoxalin-3-amin **89**

Bei dem Versuch, Verbindung **78e** zum Triaminopyrazolderivat **88** zu hydrieren, entstand überraschenderweise 1-Methyl-1H-pyrazolo[4,3-b]quinoxalin-3-amin **89** (Abb. 4.25).

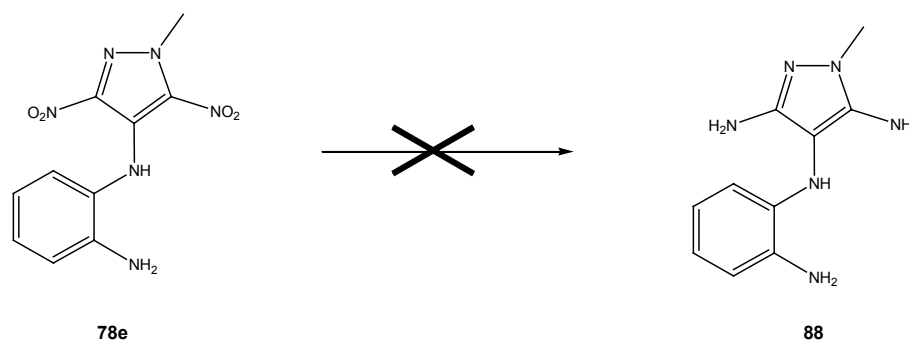
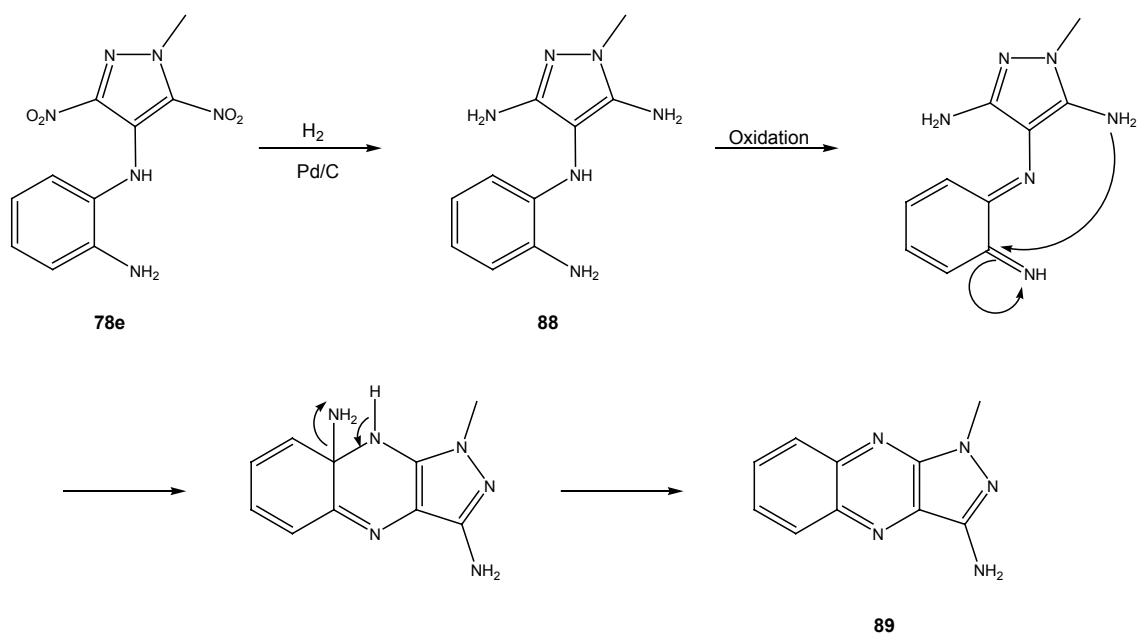


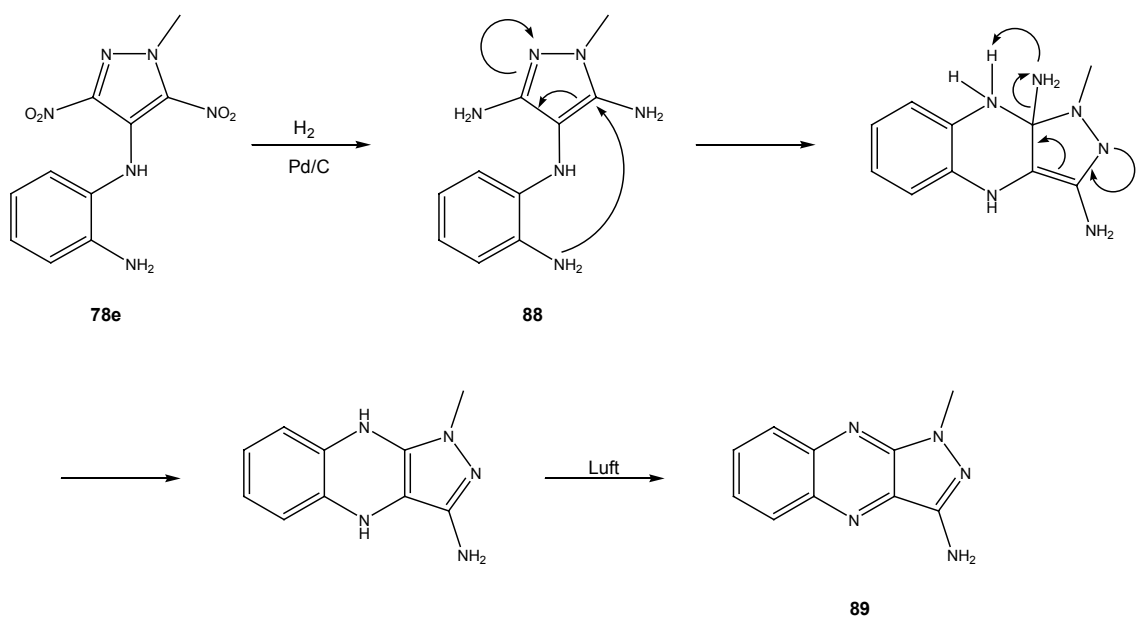
Abbildung 4.25: Fehlgeschlagener Syntheserversuch für **88**

Die Reaktion verläuft vermutlich über den in Abbildung 4.26 vorgeschlagenen Mechanismus eines intramolekularen Ringschlusses ab. Hierbei sind zwei Reaktionsmechanismen denkbar, die in der folgenden Abbildung gezeigt werden. Den wahrscheinlicheren zeigt **A** in der Abbildung. Hierbei wird das gewünschte Produkt zwar gebildet, oxidiert aber sofort zu Verbindung **89**. **B** zeigt eine denkbare Alternative zu der Produktbildung.

A



B

Abbildung 4.26: Mögliche Reaktionsmechanismen zur unerwarteten Cyclisierung von **89**

Verbindung **89** liegt als nadelförmige Kristalle vor, die eine für die Verbindungsklasse der Phenazine typische Rotfärbung haben. Von den zwei möglichen Regioisomeren, die theoretisch entstehen könnten (Methylgruppe an N1 oder N2) entsteht ausschließlich das in Abbildung 4.27 gezeigte. Dies konnte über eine Kristallstruktur bewiesen werden (Abb. 4.27).

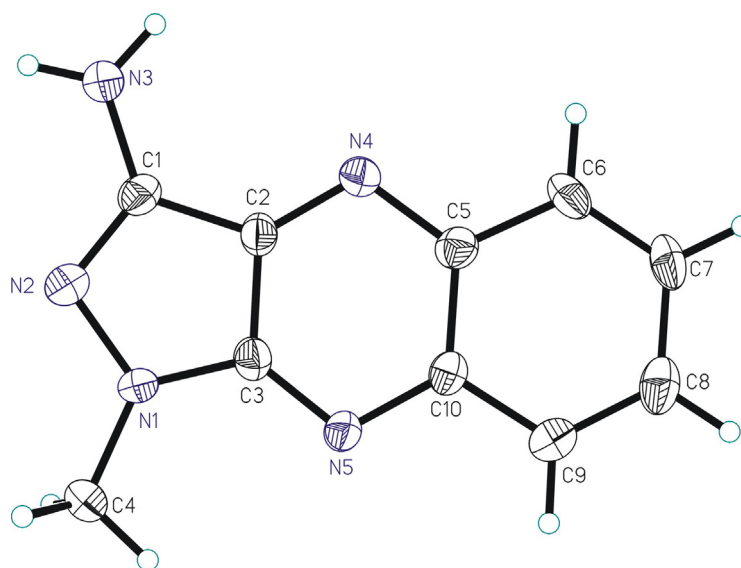
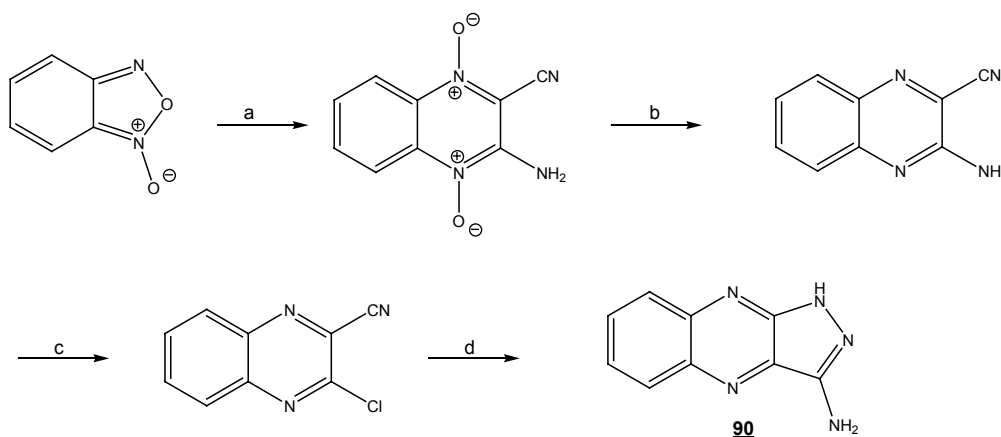


Abbildung 4.27: Kristallstruktur von **89**

Verbindung **89** ließ sich mit Natriumdithionit reduzieren. Dieser Vorgang ist reversibel. Messungen des Redoxpotentials gegen Ferrocen als Standard ergaben einen Wert von 1.37 V.⁹³

Das N-methylfreie Derivat **90** von Verbindung **89** wurde von G. Seifert⁹⁴ auf einem anderen Weg hergestellt (Abb. 4.28).

Verbindung **90** ist ebenfalls durch Natriumdithionit reversibel reduzierbar. Bei dieser Verbindung wurde allerdings das Redoxpotential noch nicht bestimmt. Es ist jedoch zu vermuten, dass der Wert im selben Bereich liegt, wie der für **89**.



(a) Malondinitril, DMF; (b) Na₂S₂O₇; (c) AcOH, HCl, NaNO₂; (d) H₂N-NH₂

Abbildung 4.28: Synthese von 1H-Pyrazolo[4,3-b]quinoxalin-3-amin **90** nach Seifert

4.4.8 Versuche zur Synthese von 1-(3-Amino-1-methyl-1H-pyrazolo-[4,3-b]-quinoxalin-7-yl)-ethanon **91**

Da es gelang, mit 1H-Pyrazolo[4,3-b]quinoxalin-3-amin **90** die Affinität von Triaminopyrazol zu HIV-1 TAR zu übertreffen, wurde in einem nächsten Schritt versucht, das Design zu erweitern, um eine noch höhere Affinität zu erreichen. Hierzu sollte **90** um eine Acetylgruppe erweitert werden. Diese sollte nach dem vorgeschlagenen Bindungsmodell eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zu C-39 ausbilden und so einen stabileren Komplex bilden können (Abb. 4.29).

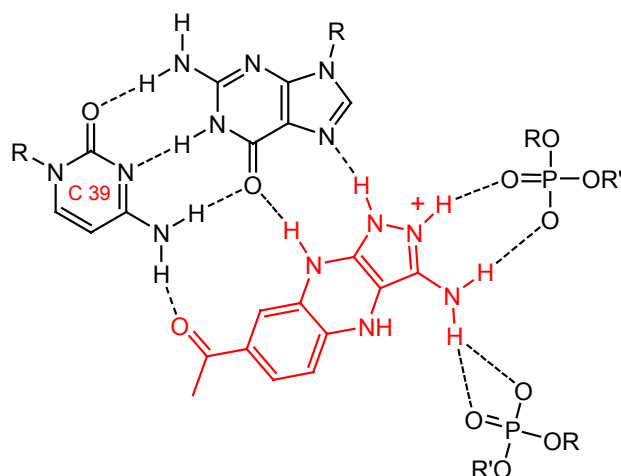
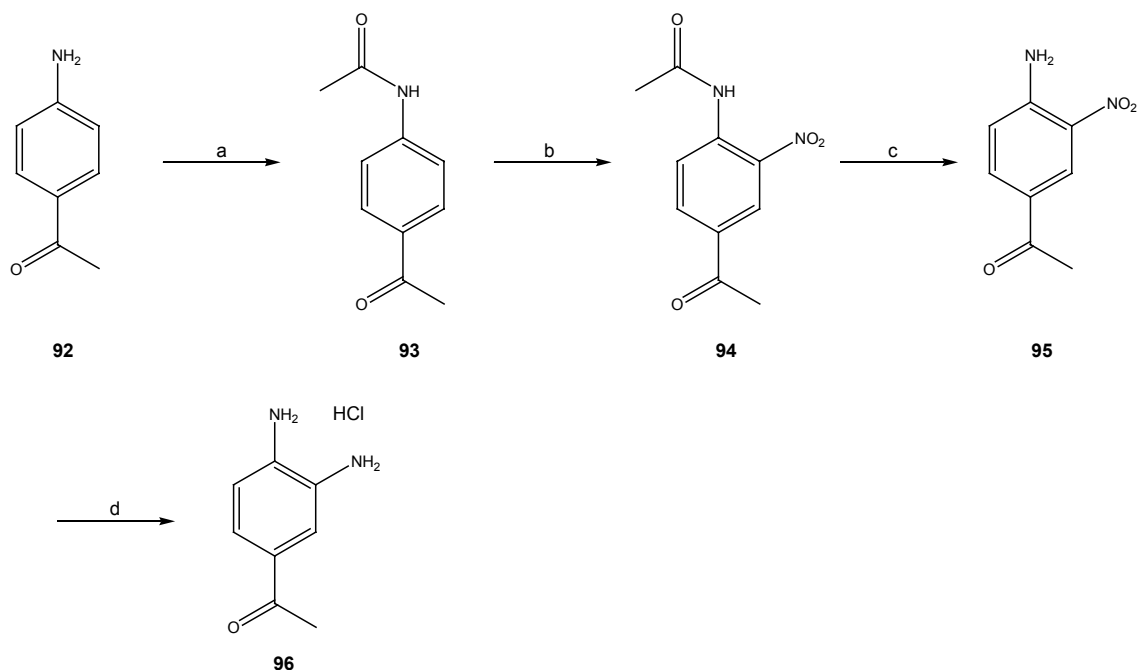


Abbildung 4.29: Bindungsmodell für Verbindung **91**

Für die Durchführung einer Synthese wurde daher zuerst ein geeigneter Baustein für die Kupplung mit **77** hergestellt. Ausgehend von 4-Aminoacetophenon **92** wurde zunächst die Aminofunktion acetylgeschützt, um im nächsten Schritt in ortho-Position zu nitrieren. Anschließende Entschützung und Reduktion der Aminofunktion mit H_2 und Pd/C bei Normaldruck ergaben **96** in guten Ausbeuten von 77 % (Abb. 4.30). Eine Erhöhung des Druckes auf bis zu 35 bar erhöhte die Ausbeute nicht, verkürzte die Reaktionsdauer jedoch auf 3.5 h. Auch unter den drastischeren Reaktionsbedingungen wurde die Acetylgruppe nicht zum Alkohol reduziert.



(a) $\text{Ac}_2\text{O}/\text{AcOH}$; (b) HNO_3 ; (c) $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$; (d) $\text{H}_2, \text{Pd/C}$

Abbildung 4.30: Synthese von 3,4-Diamino-acetophenon Hydrochlorid **96**

Die Kupplung von **97** an 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitropyrazol gelang in nur sehr schlechter Ausbeute. Es wurden verschiedene Parameter verändert, wie Temperatur, Druck und Zugabe von Basen, um die Ausbeute zu steigern. Dies gelang jedoch nicht. Die anschließende Cyclisierung analog zu der in Kapitel 4.4.7 beschriebenen Methode führte ebenfalls nicht zum Erfolg.

4.4.9 Kupplung von 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitropyrazol mit Phenolen und Thiolen

Durch FRET-Messungen (Kapitel 6) konnte gezeigt werden, dass die oxidierten Formen der Verbindungen **89** und **90** zehnfach schlechter an TAR-RNA banden als ihre reduzierten Formen. Um die Oxidation zu verhindern, die Grundstruktur der Moleküle jedoch beizubehalten, wurden Versuche unternommen, Verbindung **77** mit Phenolen und aromatischen Thiolen zu kuppeln. Als

Kupplungspartner wurden 4-Mercaptoacetophenon **97**, 4-Hydroxyacetophenon **98**, 4-Methoxybenzothiol **99** sowie 4-Methoxy-benzophenol **100** ausgewählt.

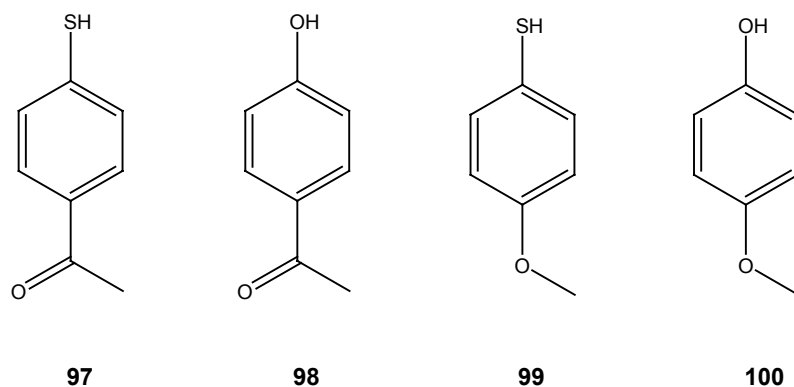


Abbildung 4.31: Strukturen von 4-Mercaptoacetophenon **97**, 4-Hydroxyacetophenon **98**, 4-Methoxybenzothiol **99** sowie 4-Methoxybenzophenol **100**

Der anschließende Ringschluss unter reduktiven Bedingungen sollte durch NaBH₄ erfolgen. Die Cyclisierung benötigt hierbei keine weitere Aminofunktion in benachbarter Position zu der entsprechenden Thiol- oder Hydroxyfunktion.

Tabelle 4.4 auf der folgender Seite gibt einen Überblick über die verschiedenen Reaktionsbedingungen, die untersucht wurden, um die Kupplung zu ermöglichen.

Tabelle 4.4: Versuche zur Kupplung von Thiolen und Phenolen mit **77**

Edukt	Lösungsmittel	Base	Temperatur [°C]	Zeit [h]	Ausbeute
97,99,98,100	DMSO	-	100	120	kein Umsatz
97,98,99,100	DMSO	K ₂ CO ₃	100	72	kein Umsatz
97,98,99,100	DMSO	NEt ₃	100	72	kein Umsatz
97,98,99,100	EtOH	K ₂ CO ₃	RT	48	kein Umsatz
97,98,99,100	EtOH	NaOH	60	48	kein Umsatz
97,98,99,100	EtOH	NEt ₃	80	72	kein Umsatz
97,98,99,100	MeOH	K ₂ CO ₃	RT	48	kein Umsatz
97,98,99,100	MeOH	KOH	60	48	kein Umsatz
97,98	THF	NaH	0	24	Spuren
99	THF	NaH	0	0.5	45 %
100	THF	NaH	0	0.5	83 %

Hierbei zeigte sich eindeutig, dass nur mit NaH als Base eine Kupplung, zumindest die der Methoxyderivate **99** und **100**, mit **77** möglich ist. Die Acetophenonderivate zeigten sich auch hier als inert.

4.4.10 Synthese von 1-*H*-3,5-Diamino-4-aminomethylpyrazol

FRET-Messungen (Kapitel 6) zeigten, dass die N-Methylderivate des Triaminopyrazols deutlich schlechtere IC₅₀-Werte zeigten als deren 1-*H*-Derivate. Diese Beobachtung ist, im Einklang mit dem von uns vorgeschlagenen Bindungsmodell (Kapitel 1), durch den Verlust einer Wasserstoffbrücke zu erklären. Der schlechtere IC₅₀-Wert von Verbindung **80c** (Abb. 4.32) gegenüber der Stammverbindung Triaminopyrazol widersprach jedoch dem allgemeinen Prinzip, durch eine Erhöhung der positiven Ladung eine höhere Affinität zu RNA zu erhalten.

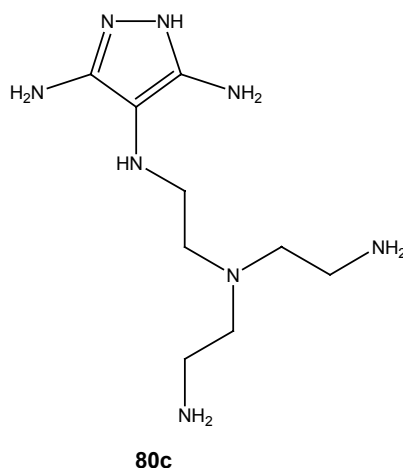
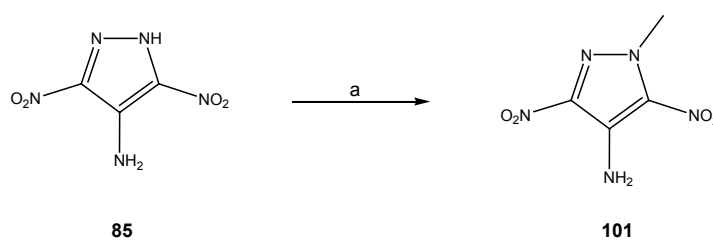


Abbildung 4.32: Struktur von Verbindung **80c**

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass eine Alkylsubstitution in 4-Position dazu führt, dass die Alkylkette aus der Ringebene herausragt und so nur noch zu einer verminderten Bindung in der Bulgeregion von TAR fähig ist. Um diese Theorie zu untermauern, wurde 4-Aminomethyl-3,5-aminopyrazol **104** synthetisiert und auf seine Bindungseigenschaften untersucht (Kapitel 6). Die Synthese von **104** konnte nicht durch eine einfache Methylierung von 4-Amino-3,5-dinitropyrazol und anschließende Reduktion der Nitrogruppen erfolgen, da hier selektiv nur das 1-N-Methylprodukt erhalten wurde (Abb. 4.32).

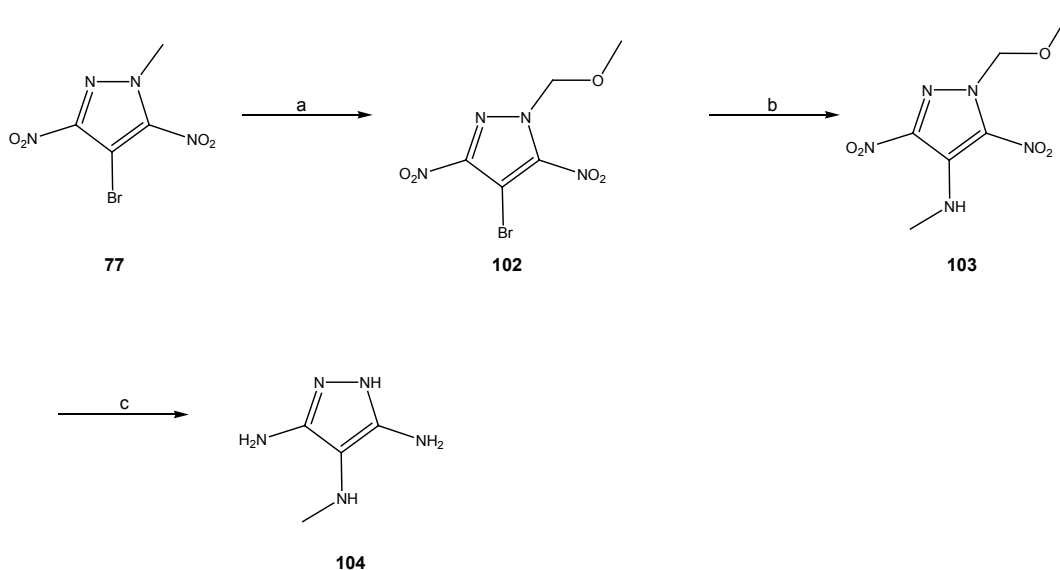


(a) KOH, MeI

Abbildung 4.33: 1-N-Methylierung von Verbindung **85**

Daher wurde zunächst die Methylgruppe von 4-Brom-1-N-methyl-3,5-dinitropyrazol **77** durch Rutheniumkatalyse mit Wasserstoffperoxid in den Methylether **102** überführt. Reaktion mit Methylamin und anschließende

Reduktion des Rohprodukts führte nach saurer Aufarbeitung zu dem gewünschten Produkt (Abb. 4.33).

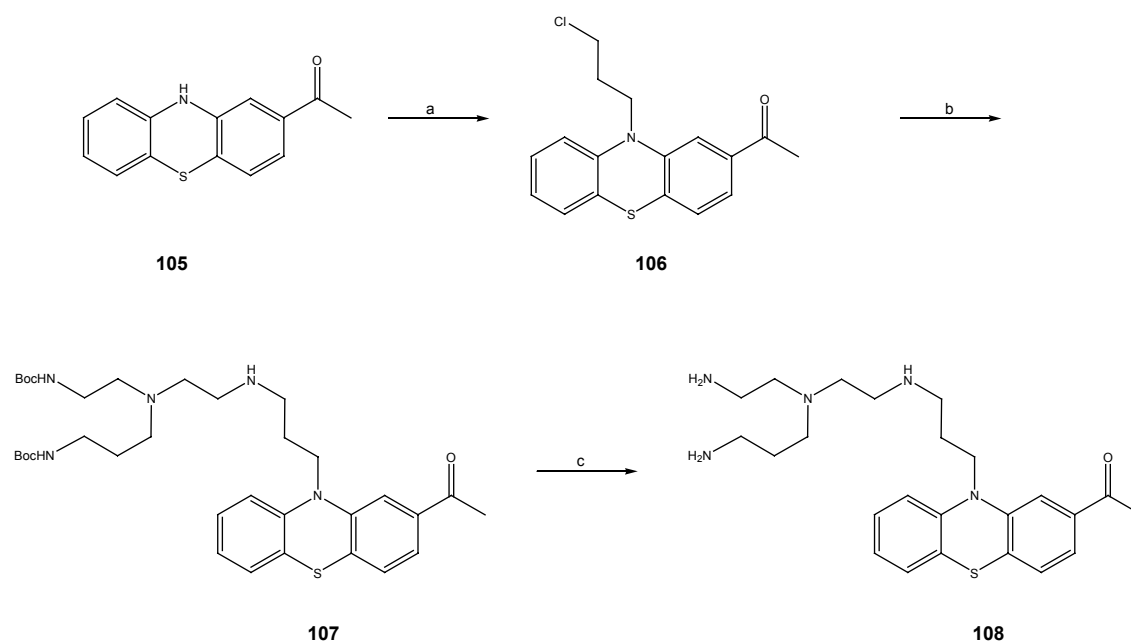


(a) MeOH , H_2O_2 , RuCl_3 ; (b) MeNH_2 ; (c) H_2 , Pd/C , HCl

Abbildung 4.34: Synthese von Verbindung **104**

4.5 Synthese von Acetylpromazin und Derivaten

Neben der Synthese von Triaminopyrazol und seinen Derivaten wurde, inspiriert durch eine Arbeit aus dem Jahr 2002 von James⁹⁵, ein Acetylpromazinderivat hergestellt und auf seine Bindungseigenschaften mit HIV-1 TAR untersucht. Das durch ein virtuelles Screening von käuflich erhältlichen Verbindungen gefundene Acetylpromazin **43** wurde als nanomolarer Inhibitor für die tat-TAR-Komplexbildung vorgestellt. Um dessen Bindungsaffinität zu erhöhen, wurde Verbindung **108** synthetisiert. Die Erhöhung der positiven Ladung durch die Verlängerung des Moleküls um eine TREN-Einheit schafft ein Grundgerüst, das den erfolgreichen Acridin-Liganden sehr ähnlich ist. Abbildung 4.34 zeigt den Syntheseweg zu Verbindung **108**.



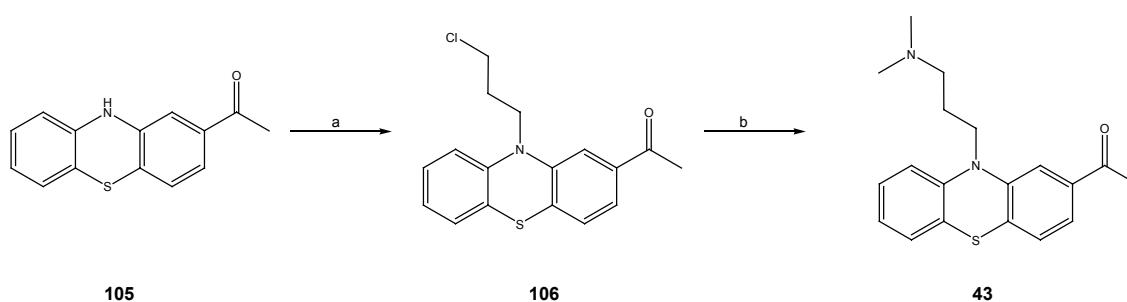
(a) NaH, Br-(CH₂)₃-Cl; (b) K₂CO₃, Bis-boc-tren; (c) SOCl₂

Abbildung 4.35: Synthese von **108**

Verbindung **105** wurde mit 1-Brom-3-chlorpropan substituiert. Bei dieser Reaktion entsteht als Nebenprodukt durch die Eliminierung von Chlor bis zu ca.

20% das allylsubstituierte Produkt. Auch durch die Variation der Basen gelang es nicht, dessen Entstehung zu unterdrücken. Die Kupplung von **106** mit einem Bis-boc-geschützten TREN-Derivat und die anschließende Abspaltung der Schutzgruppen durch methanolische HCl verliefen in guten Ausbeuten.

Für einen Vergleich der biologischen Eigenschaften von **108** mit dem von James publizierten Acetylpromazin **43** war es nötig, dieses selbst zu synthetisieren, da es zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit nicht mehr kommerziell erhältlich war. Die Synthese gelang, wieder ausgehend von Verbindung **105**, in zwei Schritten (Abb. 4.35).



(a) NaH, Br-(CH₂)₃-Cl; (b) K₂CO₃, HNMe₂

Abbildung 4.36: Synthese von Acetylpromazin **43**

4.6 Versuche zur Darstellung von nichtnatürlichen Aminosäurederivaten

Um die Bindungseigenschaften des Triaminopyrazols weiter zu erhöhen, wurde nun versucht, diesen Strukturteil mit einer Aminosäure zu verbinden. Ziel war es, durch den Aufbau von solchen nichtnatürlichen Aminosäuren kupplungsfähige Bausteine in Händen zu haben, um diese dann in kombinatorische Bibliotheken (Kapitel 5) einzubauen. Als mögliche Ausgangsprodukte wurden Cystein, Lysin und Serin gewählt. Diese Aminosäuren sollten mit einem 4-Brom -3,5-dinitropyrazolderivat gekuppelt werden (Abb.4.36).

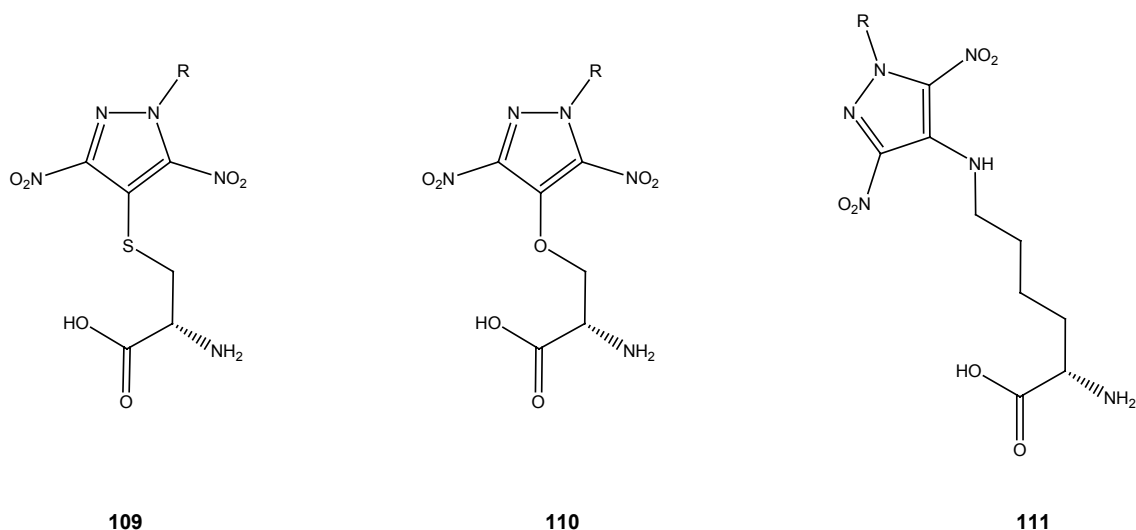
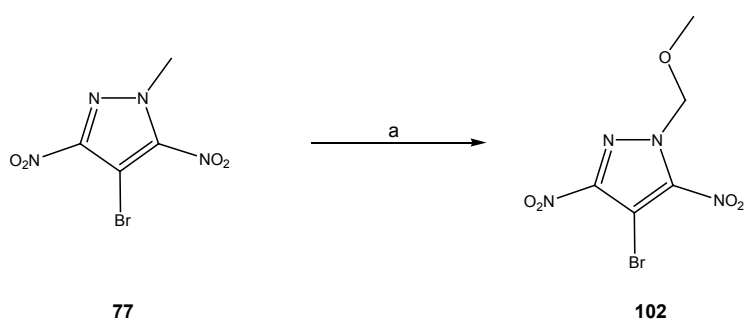


Abbildung 4.37: Mögliche kupplungsfähige nichtnatürliche Aminosäuren

Eine wichtige Anforderung an ein solches Derivat bestand darin, dass der Stickstoff des Ringes geschützt sein musste, um hier eine ungewollte Substitution während einer späteren Festphasenpeptidsynthese zu verhindern. Da die Entschützung der N-Methylgruppe durch die Reaktion mit Pyridiniumhydrochlorid drastische Temperaturen erforderte und die Ausbeuten dieser Reaktion relativ niedrig waren, wurde die oben beschriebene Verbindung **102** als mögliches Edukt für eine Kupplung in Erwägung gezogen (Abb. 4.37).



(a) RuCl_3 , H_2O_2 , KOH

Abbildung 4.38: Synthese von Verbindung **102**

Da die Etherschutzgruppe von **102** säurelabil ist, bietet sie den Vorteil, dass sie auf der letzten Stufe einer Festphasensynthese in einem Schritt zusammen mit den Schutzgruppen der Seitenketten der Aminosäure abspaltbar wäre. Die Nitrogruppen als synthetische Vorläufer der Aminogruppen sollten auf einer späten Synthesestufe schließlich an der festen Phase, z.B. durch die SmI_2 , reduziert werden.

Es wurden verschiedene Reaktionsbedingungen für die Reaktion zwischen **102** und Cystein, Lysin und Serin getestet. Tabelle 4.5 zeigt einen Überblick der verschiedenen Ansätze. Variiert wurden Lösungsmittel und Base sowie Temperatur der Reaktionen. In den meisten Fällen wurde kein Umsatz der Reaktanden festgestellt. Bei den Reaktionen in NMP und Acetonitril konnte über eine DC-Kontrolle das Entstehen von Produkten gezeigt werden, diese entstanden aber nur in geringer Menge

Tabelle 4.5: Reaktionsbedingungen für die Reaktion von **102** mit Lysin, Cystein und Serin

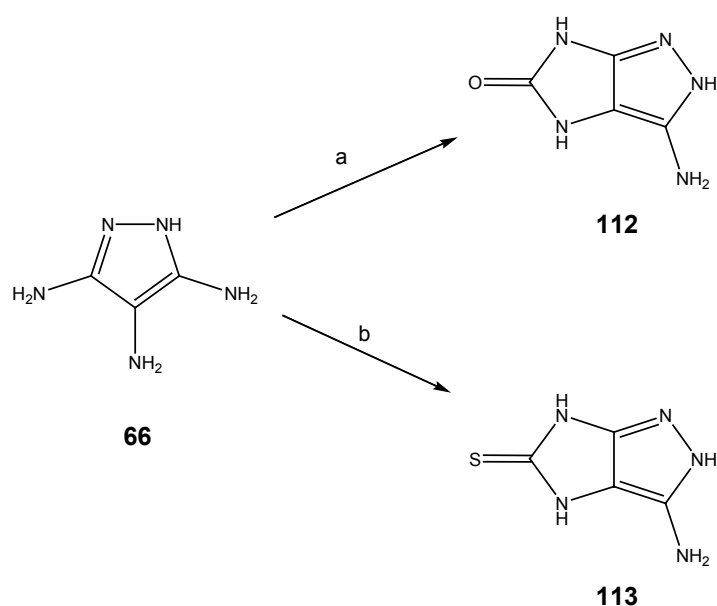
Aminosäure	Lösungsmittel	Base	Temperatur [°C]	Zeit [h]	Ausbeute [%]
Lysin	DMSO	-	25	120	0 ^a
Cystein	DMSO	-	25	120	0 ^a
Serin	DMSO	-	25	120	0 ^a
Lysin	DMSO	K_2CO_3 , NaOH	80	72	0 ^a
Cystein	DMSO	K_2CO_3 , NaOH	80	72	0 ^a
Serin	DMSO	K_2CO_3 , NaOH	80	72	0 ^a
Lysin	Acetonitril	NaH	25-70	48	0 ^b
Cystein	Acetonitril	NaH	25-70	48	0 ^b
Serin	Acetonitril	NaH	25-70	48	0 ^b
Lysin	NMP	Et_3N	120	96	0 ^b
Cystein	NMP	Et_3N	120	96	0 ^b
Serin	NMP	Et_3N	120	96	0 ^b
Lysin	DMF	DMAP	25-60	24	0 ^a

Cystein	DMF	DMAP	25-60	24	0 ^a
Serin	DMF	DMAP	25-60	24	0 ^a
Lysin	MeOH	Et ₃ N, KOH, Cs ₂ CO ₃	25	24-48	0 ^b
Cystein	MeOH	Et ₃ N, KOH, Cs ₂ CO ₃	25	24-48	0 ^b
Serin	MeOH	Et ₃ N, KOH, Cs ₂ CO ₃	25	24-48	0 ^b

^a Edukt konnte reisoliert werden; ^b geringer Umsatz durch DC nachgewiesen

4.7 Synthese von bicyclischen Derivaten von Triaminopyrazol **66**

Um weitere Derivate des Triaminopyrazols zu erhalten, die nach unserer Bindungshypothese gute TAR-Liganden wären, wurde **66** mit Phosgen und Thiophosgen umgesetzt. (Abb. 4.38).



(a) Phosgen; (b) Thiophosgen

Abbildung 4.39: Synthese von **112** und **113**

Die Umsetzung gelang in 61 % Ausbeute für **112** und in 52 % für Verbindung **113**.

5 Kombinatorische Bibliotheken

Nachdem die in dieser Arbeit synthetisierten Heterocyclen auf ihre Bindungseigenschaften getestet wurden (s. Kapitel 6 und 7), sollten diese Strukturmodule in kupplungsfähige Aminosäuren oder PNA-Monomere eingebaut werden. Diese Bausteine sollten dann in kombinatorische Bibliotheken eingebaut werden. Durch diese Methode wäre es möglich, eine Vielzahl von Strukturen (wie z.B. Tripeptide) zu generieren und diese auf ihre Bindungseigenschaften hin zu untersuchen.

Die kombinatorische Chemie ist ein relativ junges Gebiet, das sich in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts entwickelte. Seit dieser Zeit hat sich ihre breite Anwendbarkeit in zahlreichen Publikationen niedergeschlagen. Die ersten Versuche zur Synthese einer peptidischen Bibliothek wurden von Furka durchgeführt, der seine Ergebnisse jedoch nicht in einem Journal veröffentlichte, sondern diese notariell hinterlegte.⁹⁶ Veröffentlicht wurden diese Daten erst sechs Jahre später.⁹⁷ 1985 wurde von der Gruppe um Houghton über die Synthese einer Bibliothek aus mehreren hundert Verbindungen berichtet.⁹⁸ In den folgenden Jahren wurde die sogenannte „Split & Mix“ (oder auch „Split & Combine“) Technik entwickelt. Diese wurde wiederum zunächst von Furka beschrieben⁹⁹ und später von Lam¹⁰⁰ sowie Houghton¹⁰¹ angewendet. Lam konnte so eine Bibliothek von 2.5 Mio. Peptiden an der festen Phase herstellen. Er führte erstmals den Begriff „one bead – one compound“ ein, der beschreibt, dass sich auf jeder Harzkugel des polymeren Trägers nur eine, definierte Verbindung befindet. Diese Vielzahl an Verbindungen stellten eine enorme Herausforderung an die Analytik dar. Hierauf soll im Nachfolgenden eingegangen werden.

5.1 Kodierte kombinatorische Synthese

Im Falle einer Bibliothek, welche aus Peptiden aufgebaut ist, ist der Edman-Abbau eine der verbreiteten Analytik-Methoden zur Bestimmung der Sequenz.¹⁰² Jedoch ist dieser sehr teuer und auf natürliche Aminosäuren begrenzt. Eine weitere Methode ist die massenspektroskopische Analyse der von dem Träger abgespaltenen Peptide.¹⁰³ Die massenspektroskopische Analyse lässt jedoch keinen Rückschluss auf die Stereochemie zu. Es wurde in der Literatur darauf hingewiesen, dass die Stereochemie einen Einfluss auf die Bindung von TAR-Liganden besitzt.¹⁰⁴ Obwohl wir in unseren Arbeiten dies nicht verifizieren konnten, ist es sicherlich möglich, dass die Stereochemie von Liganden bei anderen Ziel-RNAs durchaus eine Rolle spielen kann. Daher muss, auch im Hinblick auf zukünftige Arbeiten, die Information über die Sequenz, die auf dem einzelnen polymeren Träger sitzt, auf einem anderen Weg erhalten werden. Eine Möglichkeit der Kodierung wird als Tagging bezeichnet.¹⁰⁵ Hierbei werden Reportermoleküle mit auf den Träger angebracht, die eine spätere Zuordnung möglich machen. Für die Beschaffenheit dieser Reportermoleküle gelten einige Voraussetzungen. So darf das Anbringen des Tags und der Aufbau einer Bibliothek sich nicht gegenseitig ausschließen, d.h. alle eingesetzten Komponenten müssen während der Synthese chemisch stabil bleiben. Weiterhin darf die Analyse der Tags nicht durch die Gegenwart der Kupplungsbausteine der Bibliothek beeinflusst werden. Im Idealfall müssen die Tags in einer Weise abgetrennt werden, dass sie nicht mit der Sequenz auf dem Träger in Wechselwirkung treten. Schließlich sollte der Tag nur in einer möglichst geringen Konzentration auf dem Träger angebracht werden. Dies stellt jedoch eine große Herausforderung an die Analytik dar. In der Literatur werden einige Reportermoleküle beschrieben, die diese Voraussetzungen erfüllen. Die am weitest verbreiteten sind Oligonucleotid-Tags,¹⁰⁶ sekundäre Amin-Tags,¹⁰⁷ Hochfrequenz-Tags¹⁰⁸ und Halogenaromatische-Tags.¹⁰⁹ Im Folgenden wird nur auf letztere eingegangen, da nur diese in unserer Arbeitsgruppe Verwendung finden.

Zum ersten Mal wurde in der Gruppe von Still über die Verwendung von halogenaromatischen Tags berichtet.¹¹⁰ Dort konnte diese Technik erfolgreich bei der Synthese einer Peptidbibliothek eingesetzt werden. Die folgende Abbildung zeigt die allgemeine Struktur dieser Tags, die im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls synthetisiert wurden.

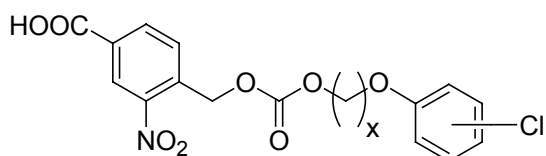


Abbildung 5.1: Allgemeine Struktur der halogenaromatischen Tagverbindungen

Parallel zur Immobilisierung der Aminosäuren werden die Tags mit einer Belegung von 2 % auf dem polymeren Träger angebracht. Nach der erfolgten Herstellung einer Bibliothek können diese Tags photochemisch bei einer Wellenlänge von 366 nm abgespalten werden. Der Mechanismus dieser Abspaltung ist in der nächsten Abbildung gezeigt.

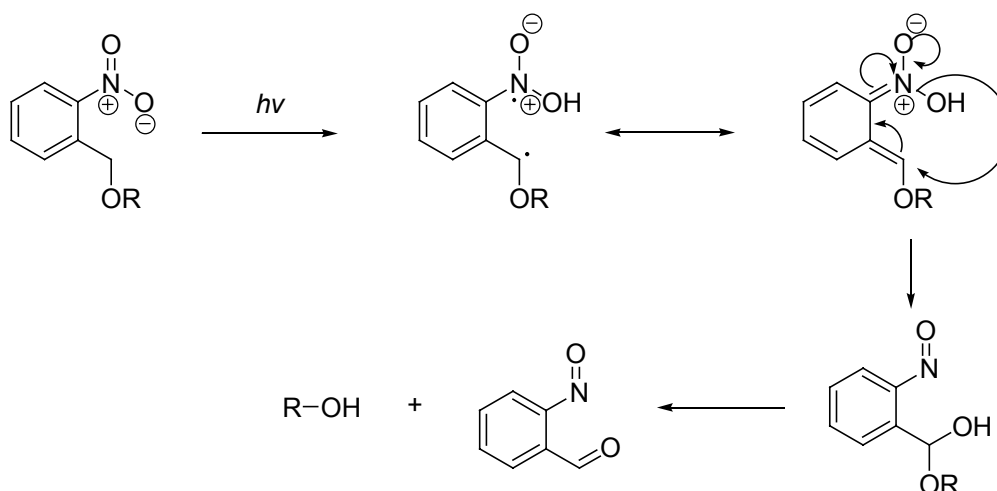


Abbildung 5.2: Mechanismus der photochemischen Tagabspaltung

Die nun in Lösung vorliegenden Alkohol-Tags werden anschließend gas-chromatographisch mit einem μ EC-Detektor analysiert. Durch die Halogen-substituenten ist dadurch eine Analyse im pmol-Bereich möglich.

Es ist nun möglich, eine solche Bibliothek zusammen mit einem biologischen Target, z.B. einer farbstoffmarkierten RNA, zu inkubieren und auf diese Weise mögliche Liganden zu identifizieren.

5.2 Aufbau einer kombinatorischen Testbibliothek

5.2.1 Vorversuche zur Schutzgruppenstabilität

In der von Still und Rana durchgeführten Arbeit^{78,111} zur Identifizierung von peptidischen TAR-Liganden fällt auf, dass die besten Liganden kein Arginin in ihrer Sequenz enthalten. Dies ist in sofern überraschend, da das natürliche tat-Peptid sehr argininreich ist.

In einer früheren Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe¹¹², in der eine Bibliothek von Tripeptiden an der festen Phase synthetisiert wurde, ist ebenfalls keine deutliche Bevorzugung von Arginin gefunden worden. Hier zeigte sich eine deutliche Bevorzugung von Histidin. Jedoch konnten bei Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe weder mit dem *Still-Rana-Peptid* (L)Lys-(D)Lys-(D)Asn, noch mit (L)His-(L)Phe-(L)His gute Affinitäten zu TAR erhalten werden. Daher wurde vermutet, dass diese Diskrepanz möglicherweise durch eine nicht vollständige Abspaltung der Schutzgruppe des Arginins im Abschluss der Synthese der Bibliothek zu erklären ist. In beiden Synthesen der Bibliotheken wurde Pmc-geschütztes Arginin als Kupplungsbaustein eingesetzt. Im letzten Schritt der Synthese wurden alle Schutzgruppen für 2 h sauer abgespalten. Sollte diese Zeit nicht für eine vollständige Abspaltung ausreichen, so wäre die Guanidiniumfunktion von Arginin geschützt und daher nicht fähig, eine hohe Affinität zu TAR zu zeigen.

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde ein Pmc-geschütztes Trisarginin an der festen Phase hergestellt (Durchführung s. Anhang). Anschließend wurden die Schutzgruppen für mehrere Stunden sauer abgespalten. Die Abspaltungslösung wurde im Abstand von 1, 3, 6, 22 und 24 Stunden frisch aufgezo-gen, die vorherige Lösung mittels HPLC auf das Vorhandensein von Pmc hin getestet. Hierbei konnte festgestellt werden, dass selbst nach einer Abspaltungsdauer von 22 h noch geringe Mengen der Schutzgruppe in der Lösung nachgewiesen werden konnte, d. h. eine vollständige Abspaltung der Schutzgruppe ist erst nach 24-stündiger, saurer Behandlung der Tripeptide an der festen Phase erreicht. Abbildung 5.3 zeigt das HPLC-Chromatogramm des Pmc-Schutzgruppen-Nachweises in den jeweiligen Abspaltungslösungen nach der angegebenen Zeit.

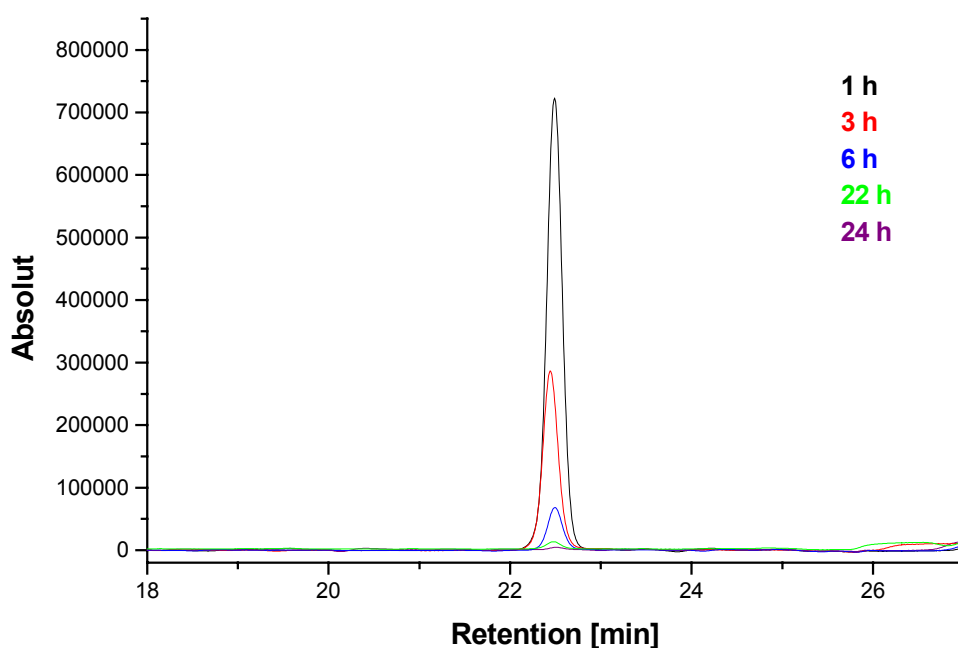


Abbildung 5.3: HPLC-Chromatogramm des Pmc-Schutzgruppennachweises in den Abspaltungslösungen

Als zusätzliche Analysemethode wurden ^1H -Festkörper-NMR-Spektroskopie an dem Trisarginin an der festen Phase durchgeführt.¹¹³ Hierzu wurde zuerst ein Vergleichsspektrum einer unbehandelten Probe mit Schutzgruppe

aufgenommen. Anschließend wurde ein Spektrum einer Probe aufgenommen, die 6 h lang sauer behandelt wurde. Hier zeigte sich keine signifikante Veränderung zu dem Vergleichsspektrum. Erst ein Spektrum einer Probe, die 24 h sauer behandelt wurde, zeigte Signale für die Protonen der Guanidiniumgruppe.

Daher ist festzustellen, dass für eine vollständige Abspaltung der Pmc-Schutzgruppe, eine Reaktionsdauer von 24 h nötig ist.

5.2.2 Synthese einer kleinen Bibliothek

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden anschließend drei verschiedene Tripeptide mit folgenden Sequenzen an der festen Phase hergestellt:

1. Arg-Arg-Arg
2. Lys-(D)Lys-Asn (Still-Rana-Peptid)
3. His-Phe-His

Jede Sequenz wurde mit jeweils einem Tag kodiert. Nach der Abspaltung der Schutzgruppen über 24 h und anschließender Trocknung wurden die drei Tripeptide an der festen Phase, in einer 1:9-Verdünnung mit acetyliertem Harz, zusammen mit fluoreszenzmarkierter TAR-RNA (Abb. 5.4) inkubiert (Durchführung s. Anhang).

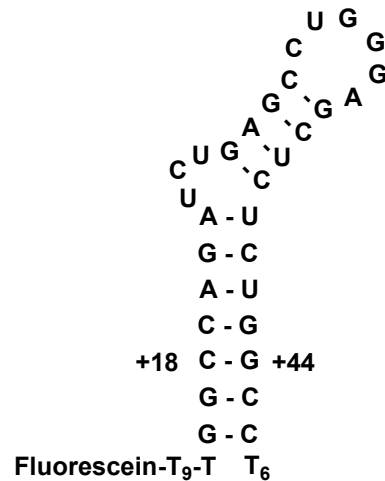


Abbildung 5.4: Struktur der fluoreszenzmarkierten TAR-RNA

Harzkugeln, die einen Liganden tragen, der eine hohe Affinität zu TAR besitzt, reichern auf ihrer Oberfläche die RNA an. Daher kann man diese Kugeln unter einem Fluoreszenzmikroskop erkennen und separieren (Abb. 5.5). Diese Kugeln wurden einzeln in GC-Probenröhrchen überführt und mit 10 µl MeOH überschichtet. Durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge von 366 nm für vier Stunden wird der Tag abgespalten und der entstehende Tag-Alkohol geht in Lösung. Diese wird mit einem GC analysiert. Durch die bekannte Retentionszeit des Alkohols ist eine eindeutige Zuordnung der Tripeptidsequenz möglich.

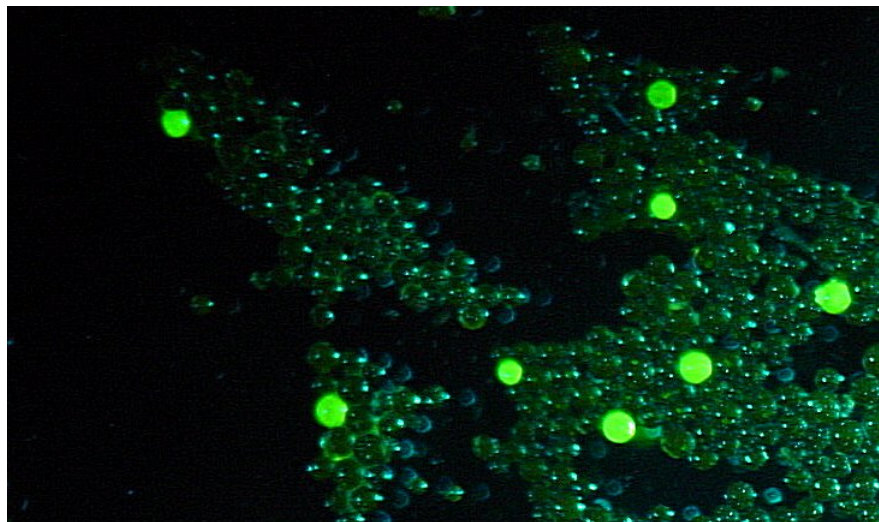


Abbildung 5.5: Leuchtende Harzkugeln unter einem Fluoreszenzmikroskop

Die Auszählung von 33 leuchtenden Kugeln und deren anschließende Analyse durch Gaschromatographie ergab folgendes Ergebnis:

Arg-Arg-Arg	21 Hits
Lys-(D)Lys-Asn	10 Hits
His-Phe-His	2 Hits

Es wurden ebenfalls 16 nichtleuchtende Kugeln als Negativkontrolle selektiert. Dabei handelte es sich ausschließlich um acetyliertes Harz ohne Tripeptide.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Arg-Arg-Arg eine deutlich höhere Affinität zu TAR zeigt als das Still-Rana-Peptid. Durch eine unzureichende Abspaltung der Schutzgruppe besteht die Gefahr, nicht die besten Liganden zu identifizieren.

6 In vitro Assay zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten

6.1 Theoretische Grundlagen des FRET- Effekts

Der sogenannte FRET-Effekt (**F**luoreszenz **R**esonanz **E**nergie **T**ransfer) beruht auf einer Fernkopplung von zwei Fluorophoren. Grundsätzlich werden bei jeder Art der Fluoreszenzspektroskopie Moleküle mit Licht einer bestimmten Wellenlänge λ_{ex} bestrahlt und in einen angeregten Singulettzustand gebracht. Wenn das Molekül wieder in seinen Grundzustand zurückfällt, emittiert es Licht einer anderen Wellenlänge λ_{em} . Der Unterschied der Wellenlängen lässt sich über den *Stokes-Shift* erklären¹¹⁴. Die durchschnittliche Lebensdauer des angeregten Zustands liegt im Bereich von einigen Nanosekunden. Daher ist die Fluoreszenzspektroskopie ein geeignetes Mittel um molekulare Vorgänge innerhalb dieser Zeitspanne zu untersuchen¹¹⁵. Gleichung 6.1 beschreibt die Intensität I der stationären Emission in Abhängigkeit von der durchschnittlichen Lebensdauer der Fluoreszenz.

$$I = \lim_{a \rightarrow \infty} \int_0^a I_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) dt = I_0 \tau \quad (6.1)$$

I_0 = Intensität bei $t = 0$

τ = durchschnittliche Lebensdauer der Fluoreszenz

Die durchschnittliche Lebensdauer τ der Fluoreszenz hängt direkt von zwei Faktoren ab. Zum einen von der Geschwindigkeitskonstanten k_r der strahlenden Deaktivierung des angeregten Zustandes, zum anderen von der Geschwindigkeitskonstanten k_{nr} der strahlungsfreien Deaktivierung des angeregten Zustandes. Weitere beeinflussende Faktoren sind die Geschwindigkeitskonstanten für die dabei auftretenden photochemischen Prozesse (k_p), die des Energietransfers (k_{et}) und , für den Fall der Anwesenheit

eines exogenen Quenchers mit der Konzentration $[Q]$, die Geschwindigkeitskonstante für das sogenannte „collisional quenching“ (k_q). Formel 6.2 zeigt die entsprechenden Zusammenhänge.

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr} + k_p + k_{et} + k_q[Q]} \quad (6.2)$$

τ = Lebensdauer der Fluoreszenz

k_r = Geschwindigkeitskonstante der strahlenden Deaktivierung

k_{nr} = Geschwindigkeitskonstante der strahlungsfreien Deaktivierung

k_p = Geschwindigkeitskonstante der photochemischen Prozesse

k_{et} = Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers

k_q = Geschwindigkeitskonstante des „collisional quenching“

Bei Anwesenheit eines Akzeptors vereinfacht sich Formel 6.2, da τ nur noch von k_{et} abhängt. Durch die resonante Übertragung der Energie eines Donorfluorophors auf ein geeignetes Akzeptorfluorophor wird real die Emission des Donors gequencht. Die Fluoreszenz des Donors verringert sich und die des Akzeptors erhöht sich. Es gibt zwei notwendige Kriterien für die Effizienz des strahlungslosen Energietransfers. Den räumlichen Abstand zwischen den beiden Fluorophoren und die Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors der beteiligten Fluorophore. Der Abstand zwischen Donor und Akzeptor, bei dem genau 50 % der Strahlungsenergie des Donors auf den Akzeptor übertragen wird, ist als Förster-Abstand R_0 definiert. Die Rate des Energietransfers k_{et} ist durch den Abstand R von Donor und Akzeptor bestimmt und wird ausgedrückt durch folgende Gleichung:

$$k_{et} = \frac{1}{\tau_D} \cdot \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad (6.3)$$

R_0 = Förster-Radius

R = Abstand Donor-Akzeptor

τ_D = Lebenszeit Donor ohne Akzeptor

Verschiedene Faktoren beeinflussen den Förster-Abstand R_0 : Der Brechungsindex des Lösungsmittels n , die Quantenausbeute ϕ_D des Donors ohne den Akzeptor, das Überlappungsintegral zwischen dem Donor und dem Akzeptor und die jeweilige Orientierung der Übergangsdipolmomente, die durch den Faktor k^2 ausgedrückt werden. Bei freier Verteilung und Beweglichkeit der beteiligten Fluorophore kann für k^2 der Wert $2/3$ eingesetzt werden (Formel 6.4).

$$R_0^6 = \frac{k^2 \phi_D J_{DA}}{n^4} \quad (6.4)$$

k^2 = Orientierung der Dipolmomente

ϕ_D = Quantenausbeute Donor ohne Akzeptor

J_{DA} = Überlappungsintegral Donor-Akzeptor

n = Brechungsindex des Lösungsmittels

Damit bestimmen nur noch der Förster-Abstand R_0 und der Abstand R der beteiligten Fluorophore der Effizienz E des Energietransfers (Formel 1.5).

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad (6.5)$$

τ_D = Lebensdauer der Donorfluoreszenz

R_0 = Charakteristischer Transferabstand

R = aktueller Abstand Donor-Akzeptor

Für den experimentellen Gebrauch wird Formel 1.6 verwendet, in der die experimentell bestimmten Messgrößen I_{DA} und I_D eingesetzt werden können.

$$E = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} \quad (6.6)$$

I_{DA} = normierte Intensität des Donors bei Anwesenheit eines Akzeptors

I_D = normierte Intensität des Donors bei Abwesenheit eines Akzeptors

6.2 FRET-Assay zur Bestimmung der Bindungsaffinität

Die zuvor synthetisierten potentiellen TAR-Liganden sollten nun in einem, gegenüber Matsumoto et al.¹¹⁶ leicht modifizierten, Assay auf ihre Bindungsaffinität hin überprüft werden. Abbildung 6.1 zeigt einen schematischen Aufbau des Assays.

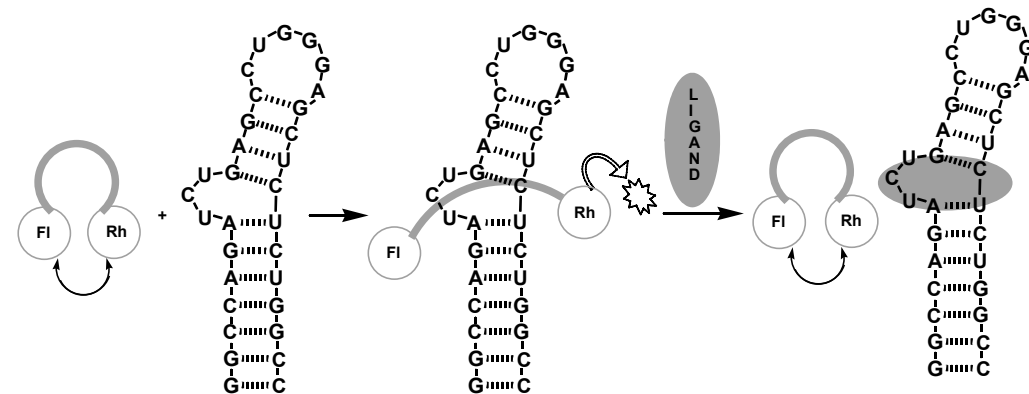


Abbildung 6.1: Schematischer Aufbau des FRET-Assays

In dem in der vorliegenden Arbeit angewandten Assay wurde ein Ausschnitt aus der Bindungssequenz des tat-Peptids verwendet, das an den endständigen Termini mit Fluorescein (FI) und Rhodamin (Rh) markiert wurde. Fluorescein wurde dabei an der festen Phase am Carboxyterminus eingeführt, während Rhodamin am N-Terminus über ein Maleinimid am Cysteinrest gekuppelt wurde (tat₄₉₋₅₇-Sequenz: Fluorescein-AAARKKRRQRRRAAAC-Rhodamin, FtatRh). Um Wechselwirkungen der beiden Farbstoffe mit der TAR-RNA zu vermeiden, wurden an beiden Enden des Peptids jeweils drei Alanine eingeführt, die als Spacer dienten (Abb.6.2).

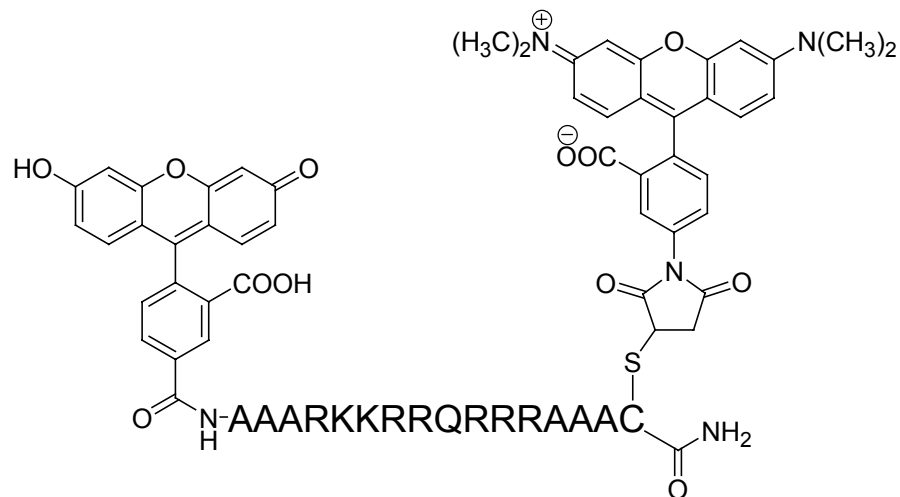


Abbildung 6.2: Farbstoffgelabeltes tat-Peptid (FRET-Rhd)

Rhodamin und Fluorescein stellen ein ideales Paar dar, um einen FRET-Effekt zu beobachten. Wenn das Peptid einen Komplex mit der TAR-RNA eingeht, nehmen beide Farbstoffe einen Abstand zueinander ein, der nach der *Förster-Gleichung* zu einem starkem FRET-Effekt führt. Wird Fluorescein bei einer Wellenlänge von 490 nm angeregt, emittiert es Licht der Wellenlänge 520 nm. Dies führt zu einer Übertragung auf das Rhodamin, welches ein Absorptionsmaximum bei 540 nm besitzt und dann bei 590 nm die höchste Emission hat. Im nicht gebundenen Zustand liegt das markierte tat-Peptid als sogenannte *random coil-Struktur* vor, bei der sich beide Farbstoffe zu nahe kommen. Dies hat zur Folge, dass es zu einer Auslöschung des Signals kommt. Dagegen kommt es im gebundenen Zustand mit der TAR-RNA zu einer maximalen Verstärkung des Signals. In Abweichung des von Matsumoto et al. beschriebenen Assays, wurden die Messungen unter leicht modifizierten Bedingungen durchgeführt, die durch das Messgerät bedingt waren. Die Einstrahlung erfolgte bei einer Wellenlänge von 544 nm. Der Faktor der Verstärkung zwischen ungebundenem und gebundenem Zustand betrug in diesem Assay in etwa 2.4. Die Messung erfolgten üblicherweise in einem Verstärkungsbereich von 2.2-2.4. Die Konzentrationen von tat-Peptid und TAR-RNA betrugen dabei jeweils 100 nM. Ein etwas heikler Aspekt bei der Durchführung des FRET-Assays ist die exakte Konzentrationsbestimmung der

TAR-RNA. Diese wurde durch eine *in vitro*-Transkription hergestellt. Nach erfolgter Transkription der RNA wurde das Transkript durch eine Gel-Ausschlußchromatographie aufgereinigt. Leider war es nicht möglich, sämtliche überschüssigen Nukleinsäuretriphosphate (NTPs) zu entfernen. Eine Wiederholung der Aufreinigung konnte dieses Ergebnis nicht verbessern. Da überschüssige NTPs und Abbruchsequenzen eine Konzentrationsbestimmung über eine UV-Messung erheblich verfälschen, wurde die TAR-RNA einer Transkription mittels PAGE gereinigt. Hierbei gelang die vollständige Abspaltung aller Abbruchsequenzen und überschüssiger NTPs. Da nun die Konzentration der TAR-RNA exakt bestimmt werden konnte, wurde von V. Ludwig¹¹⁷ mit dieser gereinigten RNA der maximale Fluoreszenz-Faktor durch Titration bestimmt. Hierzu wurden 100 nM tat-Peptid mit der TAR-RNA titriert. Bei einer 1:1 Stöchiometrie ergab sich hier ein Wert von 2.6. Da die Abweichung dieses Wertes von dem für die nicht PAGE-gereinigten TAR-Transkripte von 2.4 nicht sehr hoch war, wurden für alle IC₅₀-Bestimmungen die mit deutlich weniger Aufwand aufgereinigten TAR-RNAs verwendet.

6.3 Experimentelle Bestimmung der IC₅₀-Werte im FRET-Assay

Die Messungen der IC₅₀-Werte der synthetisierten Heterocyclen wurden in 96er-Microtiterplatten durchgeführt. Eine detaillierte Übersicht der genauen experimentellen Bedingungen ist im Anhang zu finden. Zu Beginn jeder Messung wurden das farbstoffmarkierte tat-Peptid alleine, sowie das tat-Peptid im Komplex mit TAR-RNA zusammen vermessen. Aus den beiden so erhaltenen Werten der relativen Fluoreszenz wurde der Verstärkungsfaktor bestimmt, der mindestens bei 2.1 und höchstens bei 2.4 lag. Der IC₅₀-Wert ergab sich aus dem arithmetischen Mittel der Emissionswerte des reinen Peptids sowie des Peptid-RNA-Komplexes. Anschließend wurden drei Einzelwertbestimmungen bei Konzentrationen von 10, 100 und 1000 µM mit der jeweiligen zu testenden Verbindung durchgeführt, um den ungefähren

Konzentrationsbereich zu ermitteln, in dem der IC_{50} -Wert liegt. Im interessanten Konzentrationsbereich wurde dann eine Messreihe mit absteigenden Konzentrationen durchgeführt. Diese Messwerte wurden graphisch aufgetragen und aus den erhaltenen Kurven der jeweilige IC_{50} -Wert bestimmt. Abbildung 6.3 zeigt eine typische graphische Auswertung der Daten für Triaminopyrazol **66**.

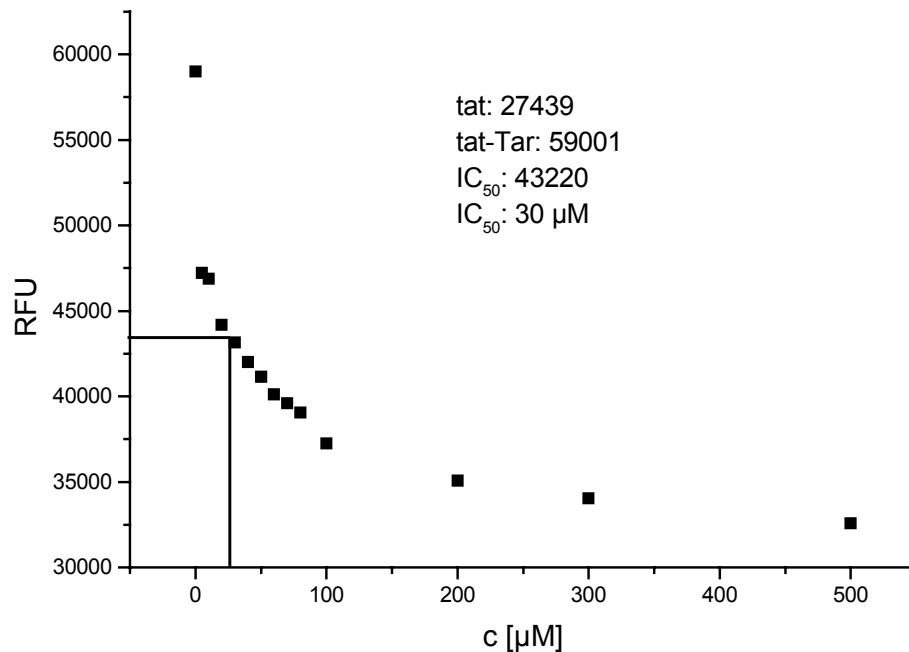


Abbildung 6.3: FRET-Kurve von Triaminopyrazol **66**

In Abbildung 6.3 ist auf der y-Achse die relative Fluoreszenz (RFU) aufgetragen. Der Wert für die Fluoreszenz des tat-Peptids lag bei 27439 RFU, der des tat-TAR-Komplexes bei 59001 RFU. Daraus ergibt sich aus dem arithmetischen Mittel 43220 RFU. Die zugehörige Kompetitor-Konzentration entspricht dem IC_{50} -Wert, da hier der halbmaximale Wert der Fluoreszenzdifferenz erreicht wird. Dieser Wert wird in Abbildung 6.3 bei einer Konzentration von 30 μM Triaminopyrazol **66** erreicht.

Aussagen über Dissoziationskonstanten (K_D) sind bei dieser Messung nur dann möglich, wenn die Konzentration der eingesetzten RNA genau bekannt ist. Ist

dies der Fall, ist es zum Beispiel möglich, über Gleichung 6.7 den K_D für FtatRhd zu bestimmen.

$$I = I_0 + \frac{\Delta I}{2} \cdot \left(\frac{[RNA]_0 + [FtatRhd]_0 + K_D}{\sqrt{([RNA]_0 + [FtatRhd]_0 + K_D)^2 - 4 \cdot [RNA]_0 \cdot [FtatRhd]_0}} \right) \quad (6.7)$$

I = gemessene Intensität

I_0 = Intensität zum Zeitpunkt $t = 0$

ΔI = Differenz der Intensitäten

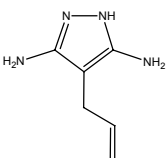
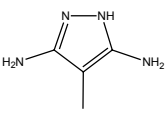
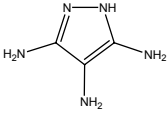
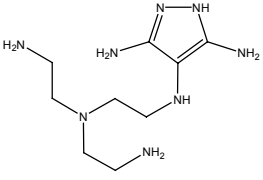
$[]_0$ = Konzentration zum Zeitpunkt $t = 0$

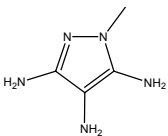
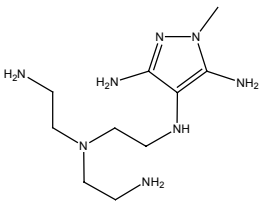
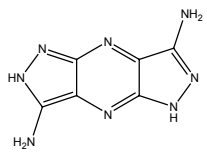
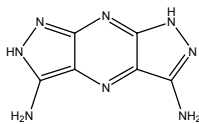
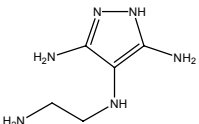
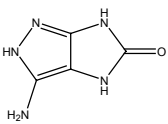
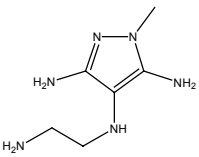
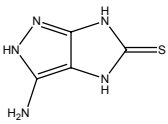
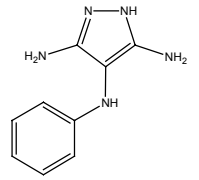
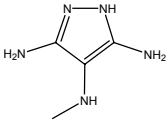
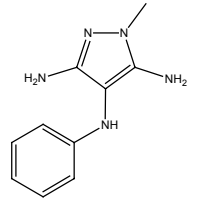
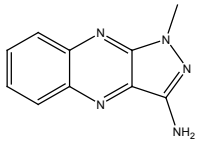
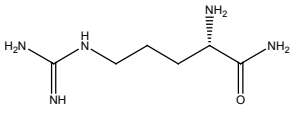
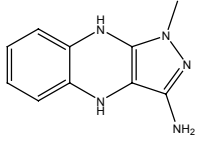
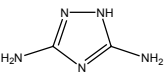
K_D = Dissoziationskonstante

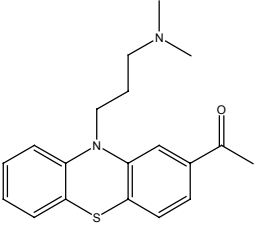
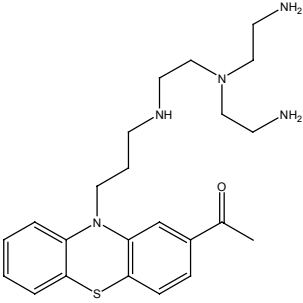
6.4 Ergebnisse der FRET-Messungen

Nachfolgend gibt Tabelle 6.1 einen Überblick über die gemessenen IC_{50} -Werte der zuvor synthetisierten Verbindungen. Die graphische Darstellung der Messungen sind im Anhang aufgeführt.

Tabelle 6.1: IC_{50} -Werte von synthetisierten Verbindungen

Nr	Verbindung	IC_{50} [μM]	Nr	Verbindung	IC_{50} [μM]
114		>5000	115		100
66		30	80d		80

Nr	Verbindung	IC ₅₀ [μM]	Nr	Verbindung	IC ₅₀ [μM]
79a		550	79d		1800
86 (87)	 / 	320 ^a	80b		170
112		300	79c		3000
113		280	80a		120
104		270	79b		2500
89		600	34		1400
89 (red.)		290	116		14000

Nr	Verbindung	IC ₅₀ [μM]	Nr	Verbindung	IC ₅₀ [μM]
43		500	108		0.05

^a Welches Regioisomer isoliert wurde konnte nicht geklärt werden.

Wie aus obenstehender Tabelle zu entnehmen ist, zeigen die N-methylierten Triaminopyrazolderivate **79a**, **79b**, **79c** und **79d** deutlich schlechtere Werte als ihre N-methylfreien Analoga. Das Phenazinderivat **89** zeigt, sowohl für seine oxidierte, wie auch für seine reduzierte Form ebenfalls relativ schlechte Werte. Dies steht im Einklang mit dem vorgeschlagenen Bindungsmodell, da hier eine mögliche Wasserstoffbrückenbindung mit Guanosin-26 verloren geht. Jedoch konnte gezeigt werden, dass das von Gunther Seifert synthetisierte methylfreie Analogon in seiner reduzierten Form einen IC₅₀-Wert von ungefähr 5 μM hat (siehe Kapitel 4). Daher werden nachfolgende Optimierungen der Leitstruktur in die Richtung dieses Strukturtyps gehen.

Triaminopyrazol **66**, mit einem Molekulargewicht von nur 113 g/mol, besitzt einen IC₅₀-Wert von 30 μM. Damit übertrifft es deutlich Werte von einigen Tripeptiden, die in unserem Arbeitskreis synthetisiert wurden¹¹⁸.

Durch die Beobachtung, dass wässrige Lösungen von **66** nach einiger Zeit eine Verfärbung nach braun zeigten, wurde vermutet, dass Oxidationsprodukte von **66** entstehen könnten (s. Kapitel 4). Um auszuschließen, dass diese Oxidationsprodukte die eigentlich aktiven Spezies darstellten, wurden diese zwei möglichen Oxidationsprodukte hergestellt und eines davon ebenfalls im FRET-Assay untersucht. Verbindung **86** (oder **87**) zeigte jedoch mit einem IC₅₀ von 320 μM einen um den Faktor 10 schlechteren Wert. In einem weiteren Experiment wurde eine Stammlösung von **66** mit einer definierten Konzentration

für sieben Tage in einem TK-Puffer bei einem pH von 7.4 Luft ausgesetzt. Anschließend wurde eine FRET-Messung mit dieser Lösung wiederholt, wobei hier der IC_{50} leicht auf von 30 μ M auf 35 μ M abfiel. Daher ist davon auszugehen, dass Triaminopyrazol und nicht die möglichen Oxidationsprodukte als Liganden wirken.

Ein Nachteil des durchgeführten FRET-Assays ist die Tatsache, dass man keine Informationen über die Bindungsstelle des Liganden erhält. Durch die Wiederholung der Versuche mit einer bulgeless-Mutante und einer loopless-Mutante von TAR wäre eine Unterscheidung zwischen der bulge- und loop-Region möglich. Sollte es sich bei **66** um einen spezifischen bulge-Binder handeln, so müsste die Affinität bei einer bulgeless-Mutante deutlich niedriger ausfallen. Das gleiche gilt im Falle eines loop-Binders und dessen Affinität zu einer loopless-Mutante. Solche Experimente wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt. Einen Hinweis darauf, dass Triaminopyrazol **66** in der bulge-Region bindet, wurde durch NMR-spektroskopische Untersuchungen mit der TAR aus HIV-2¹¹⁹, durchgeführt von Dipl. Chem. J. Ferner aus dem Arbeitskreis Prof. H. Schwalbe, geliefert. Durch Arbeiten von Williamson¹²⁰, der einen Komplex aus HIV-2 TAR mit Argininamid **34** intensiv NMR-spektroskopisch untersuchte, konnte gezeigt werden, dass **34** ein spezifischer bulge-Binder ist. Durch einen Vergleich der chemischen Verschiebungen der Protonen der bulge-Region war es möglich, Triaminopyrazol ebenfalls als bulge-Binder zu identifizieren. Abbildung 6.4 zeigt die ¹H-NMR-Spektren der Titration von HIV-2 TAR-RNA mit Triaminopyrazol mit abnehmender Stöchiometrie. Spektrum **F** zeigt TAR-RNA alleine. Die Pfeile indizieren die Verschiebung der Protonen einzelner Basen der bulge-Region, die bei Komplexbildung mit einem bulge-Binder Richtung höherem, bzw. niedrigeren Feld verschoben werden. Das Verhältnis von RNA zu Triaminopyrazol der einzelnen, darüber liegenden Spektren **E** bis **A**, gehen von 1:1 über 1:3 bis hin zu 1:27 bei Spektrum **A**.

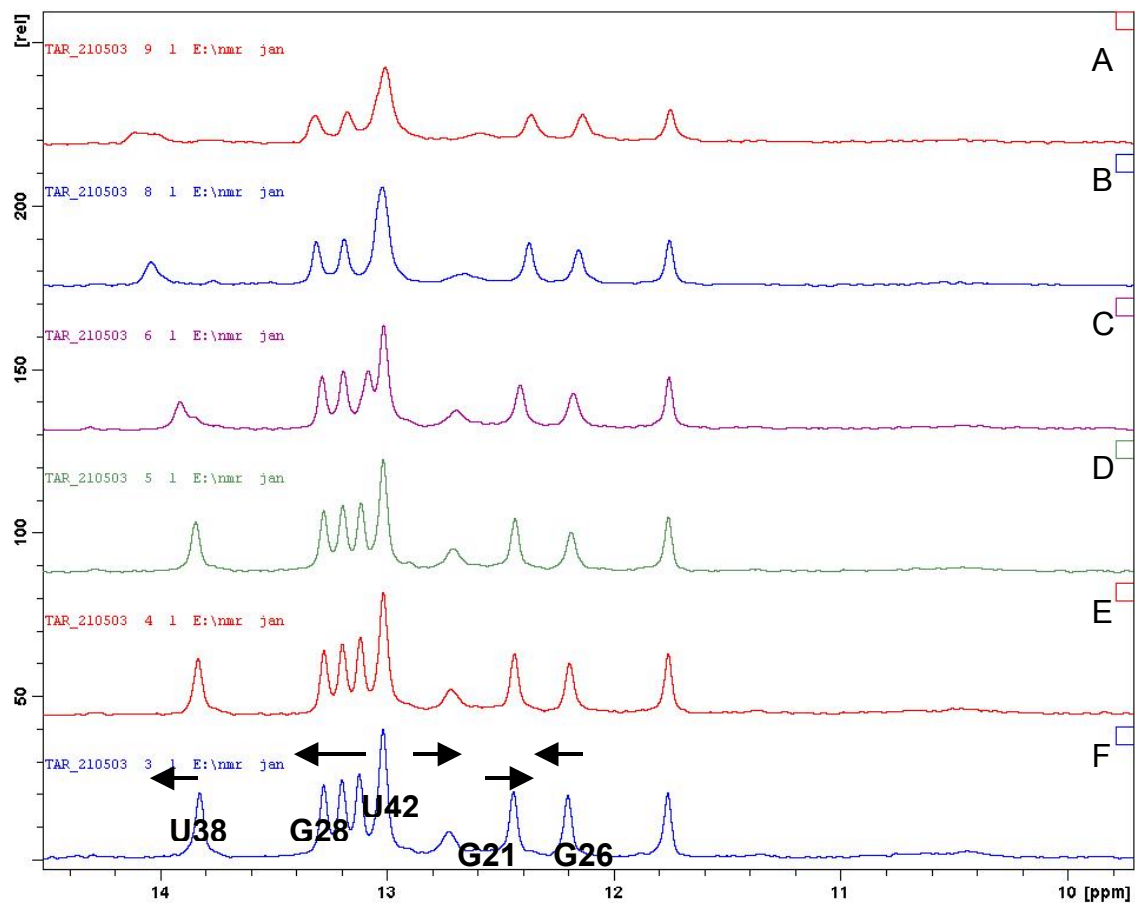


Abbildung 6.4: NMR-Spektren der Titration von HIV-2 TAR-RNA mit Triaminopyrazol 66

Anhand dieser Spektren konnte eine Dissoziationskonstante K_D berechnet werden, die um einem Wert von ca. 3 mM lag. Dieser Wert ist deutlich schlechter als erwartet. Für diese Diskrepanz lassen sich zwei Erklärungen geben. Zum einen erfolgte die Messung der NMR-Spektren mit einem Kaliumphosphat-Puffer als Lösungsmittel. Titrations der HIV-1 TAR in Gegenwart dieses Puffers zeigten, dass dieser einen erheblichen Einfluss auf die Affinität des tat-Peptids hat. Aufgrund von starken Signalschwankungen war es zwar nicht möglich, genaue Bindungsdaten zu ermitteln, die Tendenz der Messungen ging jedoch dahin, dass sich die Bindung um mindestens den Faktor 10 verschlechterte.

Ein weiterer Grund für die geringere Affinität zu HIV-2 TAR liegt darin, dass der um ein Nucleotid kleinere bulge zu klein ist, als dass Triaminopyrazol darin gut binden könnte. Einen Beweis hierfür lieferte der deutlich schlechtere IC_{50} -Wert,

der bei einer FRET-Messung mit HIV-2 TAR erhalten wurde. Dieser lag mit 1.36 mM um den Faktor 45 schlechter.

6.5 Diskussion der Ergebnisse

Bei der weiteren Betrachtung der IC_{50} -Werte aus Tabelle 6.1 zeigt sich, dass die 4-Aminoalkylderivate **80c** und **80d** schlechtere Werte zeigen als die Stammverbindung, trotz ihrer höheren positiven Ladung, die es ihnen ermöglichen sollte, besser mit dem negativen Phosphatrückgrat der RNA wechselzuwirken. Ein möglicher Grund hierfür könnte in der Tatsache liegen, dass die Alkylsubstituenten aus der Ringebeine herausragen und so mögliche Stacking-Wechselwirkungen stören. 3,5-Diamino-4-methylaminopyrazol **104**, mit einem IC_{50} -Wert von 260 μ M, scheint diese Vermutung zu untermauern.

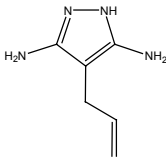
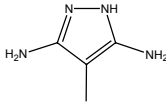
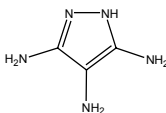
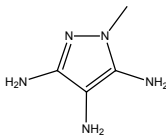
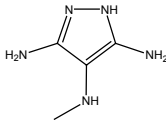
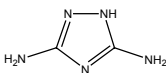
Das Harnstoffderivat **112**, sowie der entsprechende Thioharnstoff **113**, zeigen mit 300, bzw. 260 μ M eine schlechtere Affinität zu TAR. Diese sind wahrscheinlich in einem zu niedrigen pK_s -Wert begründet.

Der pK_s -Wert der synthetisierten Aminopyrazole spielte eine zentrale Rolle in der vorliegenden Arbeit. Zu Beginn dieser Arbeit konnte durch UV-Spektroskopie der pK_s -Wert von 4-Allyl-3,5-diaminopyrazol **114** mit 5.35 bestimmt werden. Die sehr schlechte Affinität zu TAR stand im Einklang mit unserem Bindungsmodell, da bei einem physiologischen pH-Wert der Stickstoff des Ringes nur in sehr geringem Anteil protoniert vorliegen kann und daher eine Wasserstoffbrücke weniger zu G26 ausgebildet wird. Eine logische Konsequenz dieser Beobachtung war die Einführung eines stärkeren Elektronendonators in 4-Position, um den pK_s -Wert zu erhöhen, was zur Synthese von 3,4,5-Triaminopyrazol **66** führte.

Messungen des pK_s -Wert von **66** ergaben wider Erwarten jedoch nur eine Erhöhung um einen Wert von 0.5 Einheiten auf 5.9. Daher kann die sehr gute Affinität von **66** für TAR nicht alleine über einen höheren pK_s -Wert erklärt werden. Hier müssen zusätzlich strukturelle Eigenschaften der verschiedenen

Aminopyrazole beachtet werden. Vergleicht man die pK_s -Werte in nachfolgender Tabelle, so fällt auf, dass diese relativ nahe beieinander liegen.

Tabelle 6.2: Gemessene pK_s -Werte von Aminopyrazolen

Verbindung	pK_s -Wert
	5.35 ^a
	5.40 ^a
	3.3/5.9 ^b
	3.2/5.5 ^b
	3.1/5.8 ^b
	4.43 ¹²¹

^a UV-Spektroskopisch ermittelt; ^b Potentiometrisch ermittelt¹²²

Bemerkenswert ist hierbei, dass 3,5-Diamino-4-methylpyrazol und sein Allylderivat einen fast identischen pK_s -Wert haben, ihre IC_{50} -Werte sich jedoch um den Faktor 50 unterscheiden. Offenbar stört der raumerfüllende Allylsubstituent die Stackingeigenschaften des Pyrazols erheblich.

Der extrem schlechte IC_{50} -Wert von Diaminotriazol von 14000 μM , wiederum ist wohl alleine auf den deutlich niedrigen pK_s -Wert von 4.43 zurückzuführen.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass für eine hohe Affinität zu TAR ein Wechselspiel zwischen geometrischer Struktur und pK_s -Wert ausschlaggebend ist.

Abschließend sei erwähnt, dass das Acetylpromazinderivat **108** mit einem IC_{50} von 50 nM einen deutlich besseren Wert als Acetylpromazin **43** besitzt, das von der Arbeitsgruppe um Thomas L. James durch ein Computerscreening gefunden wurde. Jedoch konnte in Zellkulturexperimenten, die im nächsten Kapitel beschrieben werden, gezeigt werden, dass diese Verbindungen eine hohe Zelltoxizität besitzen.

7 Zellkulturexperimente

7.1 Aufbau des Zellkulturassays

Nachdem in dem FRET-Assay *in vitro* einige vielversprechende Liganden für die TAR-RNA aus HIV-1 identifiziert werden konnten, wurden die besten Liganden in einem Zellkulturexperiment, welches von Dr. Ursula Dietrich, Georg-Speyer-Haus, entwickelt wurde, im Hinblick auf ihre Inhibierung *in vivo* untersucht. Dieses Zellkulturexperiment basiert auf einem Reporter-gen-Assay mit HeLa P4 Zellen. Diese besitzen neben den für eine HIV-Infektion benötigten CD4, CCR5 und CXCR4 Rezeptoren auch ein β -gal Gen, welches unter der Kontrolle von HIV-1 LTR nach der TAR einkloniert wurde (Abb. 7.1).

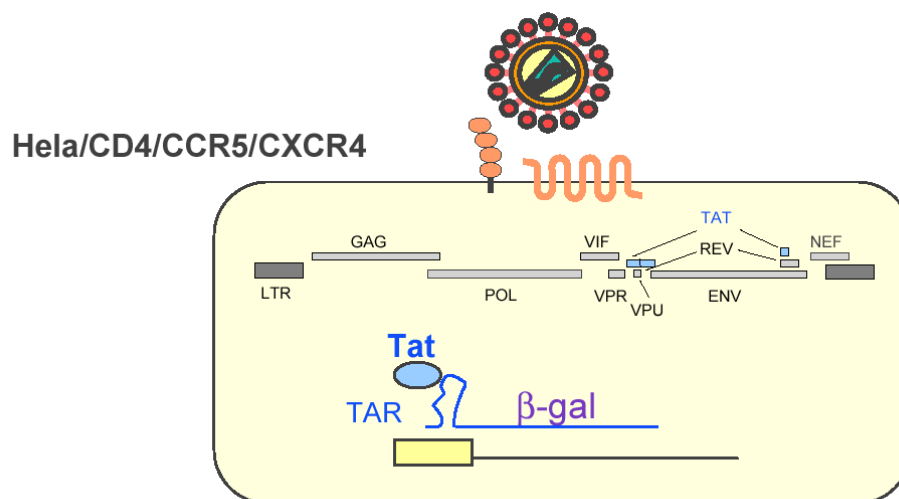
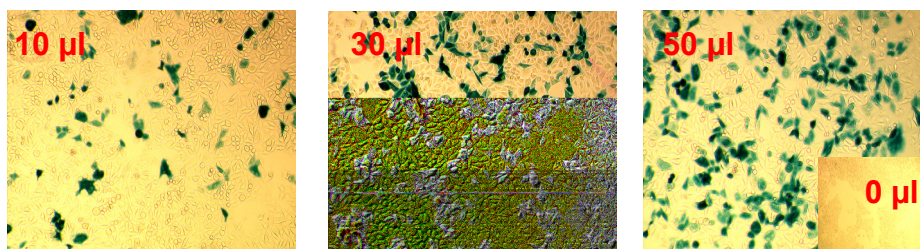


Abbildung 7.1: Schematischer Aufbau des Zellassays

Durch die Wechselwirkung von TAR mit dem tat-Peptid wird die Transkription angeschaltet und auch das β -gal Gen transkribiert. Daraufhin ist es möglich die Zellen blau anzufärben, so dass sie colorimetrisch quantifizierbar sind. Die Anzahl der blaugefärbten Zellen lässt sich so direkt mit der Inhibierung durch einen Liganden korrelieren. Die nachfolgende Abbildung zeigt diesen Assay.

Die Inhibierung der Virus-Replikation erfolgte hier durch das tat 10mer, einen bekannten Inhibitor der HIV-Replikation.

Infektion von HeLa P4/CCR5/CXCR4 mit HIV-1 Lai



Inhibierung der Infektion durch HeLa P4 mit HIV-1 Lai durch Tat 10

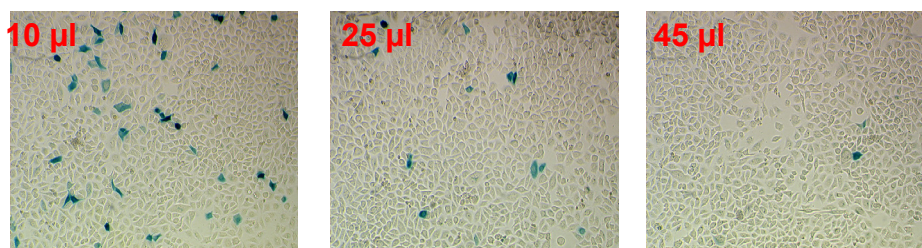


Abbildung 7.2: Fotoaufnahmen des Zellassays. Obere Zeile: Infektion der Zellen mit HIV-1 Lai; untere Zeile: Inhibierung der Infektion durch verschiedene Konzentrationen von Tat 10

Die untere Zeile der Abbildung 7.2 zeigt eine deutliche Inhibierung der HIV-Produktion, erkennbar an der Abnahme der Anzahl blaufärbter Zellen. Die Inkubationsdauer betrug hier wie auch in allen nachfolgenden Experimenten zwei Tage. Das tat 10mer besitzt in diesem Assay einen IC_{50} -Wert von 20 μ M.

7.2 Zellkulturuntersuchungen von Triaminopyrazol 66

Zunächst wurde Triaminopyrazol **66** auf seine Eigenschaften als Inhibitor untersucht. Abbildung 7.3 fasst die Versuchsdaten zusammen. Auf der y-Achse ist die Blaufärbung der Zellen in relativen Einheiten aufgetragen. Gezeigt werden die Änderungen der Blaufärbung in Abhängigkeit der Konzentration an

zugegebenen Liganden. Der halbmaximale Hemmeffekt kann hier bei einer Konzentration von ca. 50 μM beobachtet werden

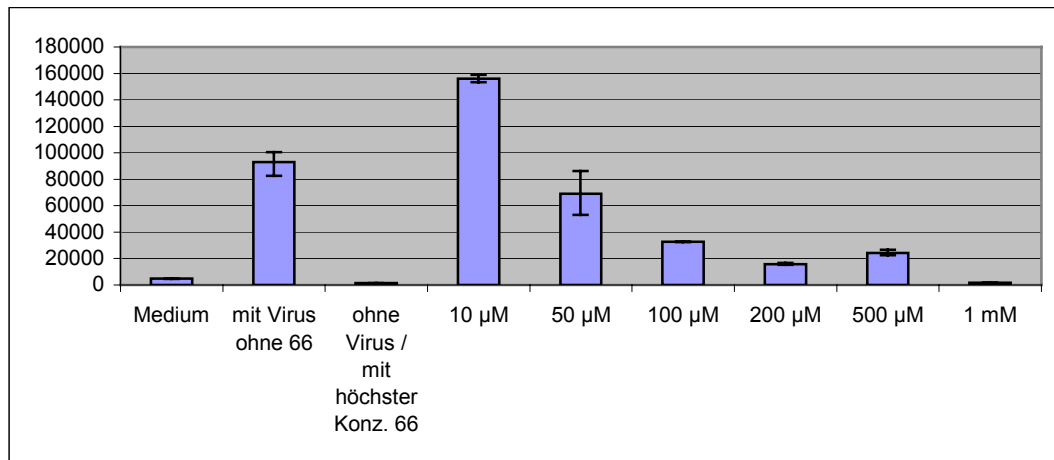


Abbildung 7.3: Hemmeffekte der HIV-Replikation durch Triaminopyrazol **66** in Abhängigkeit der Konzentration

Um auszuschließen, dass die beobachtete Hemmung der β -gal Aktivität auf toxische Eigenschaften des Triaminopyrazols zurückzuführen ist, wurde ein entsprechender Toxizitätstest durchgeführt. Hierbei wurde bis zu einer Konzentration von 500 μM keine Toxizität festgestellt (Abb. 7.4).

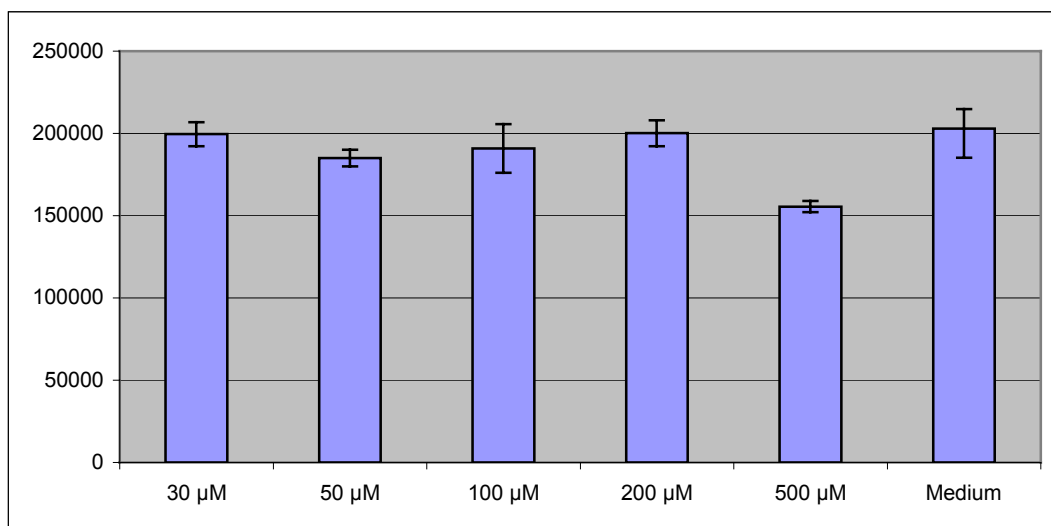


Abbildung 7.4: Toxizitätstest von Triaminopyrazol **66**

Für die Hemmung der β -gal Aktivität durch einen Liganden sind in diesem Assay prinzipiell zwei verschiedene Wirkmechanismen denkbar. Zum einen wäre der Ligand in der Lage, die tat-TAR Komplexierung zu verhindern, zum anderen wäre es aber auch möglich, dass der Ligand die Infektion durch HIV verhindert, indem er als Entry-Inhibitor wirkt. Um diese Unterscheidung vornehmen zu können, wurde der Assay modifiziert und zwei verschiedene Versuche durchgeführt. Im ersten Versuch erfolgte die Zugabe von Virus und Triaminopyrazol gleichzeitig. Im zweiten Versuch wurden die Zellen mit HIV infiziert und anschließend für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden überschüssige Viren gewaschen, erst dann erfolgte die Zugabe von Triaminopyrazol. Abbildung 7.5 zeigt die Daten dieser beiden Versuche. Da auch im zweiten Versuch eine Hemmung der β -gal Aktivität beobachtet werden konnte, ist es nahezu ausgeschlossen, dass Triaminopyrazol als Entry-Inhibitor wirkt. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass dieser Ligand in der Lage ist, die Zellmembranen zu überwinden und die Komplexierung von tat und TAR zu inhibieren.

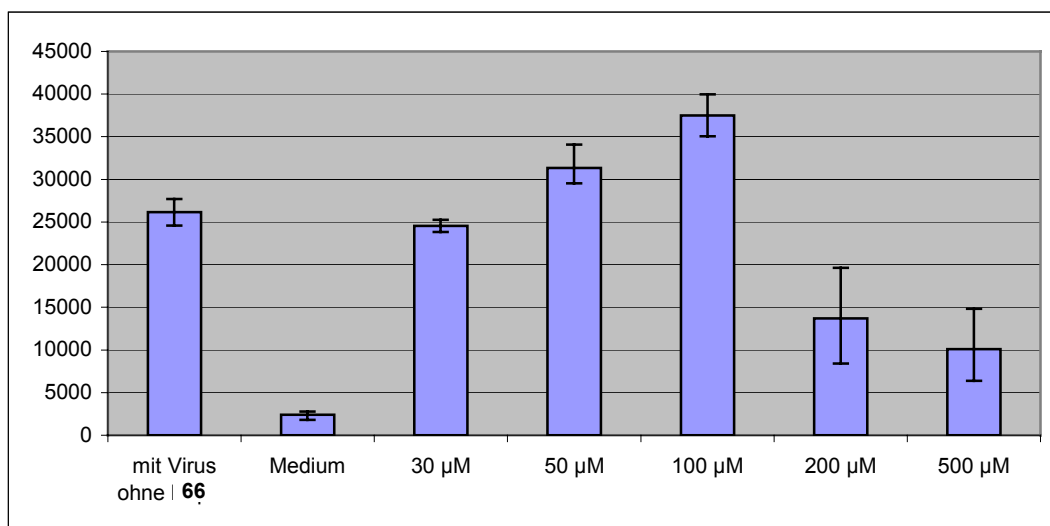


Abbildung 7.5: Hemmung der β -gal Aktivität durch Zugabe von Triaminopyrazol **66** erst nach der Infektion der Zellen mit HIV

Der mit 200 μ M höhere IC_{50} -Wert bei dieser Messung lag wahrscheinlich an einer lag-Phase, in der der Virus sich schon in den Zellen befunden hat. Das

bedeutet, dass das tat-Peptid imstande ist, die LTR zu transkribieren, während Triaminopyrazol erst noch die Zellmembran passieren musste. Ein Indiz hierfür ist, dass für das tat 10mer ebenfalls ein mit 100 μM um den Faktor 5 höherer IC_{50} -Wert festgestellt wurde.

Verbindung **66** wurde abschließend noch in einem Langzeittest auf seine Wirkung als Inhibitor untersucht. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene Versuche durchgeführt. Im ersten Versuch, dessen Ergebnis in Abbildung 7.6 graphisch dargestellt ist, wurde **66** jeweils in Konzentrationen von 100 und 200 μM zu den infizierten Zellen gegeben und im Abstand von jeweils zwei Tagen die Virusmenge im Kulturüberstand (p24 Antigen im ELISA) vermessen.

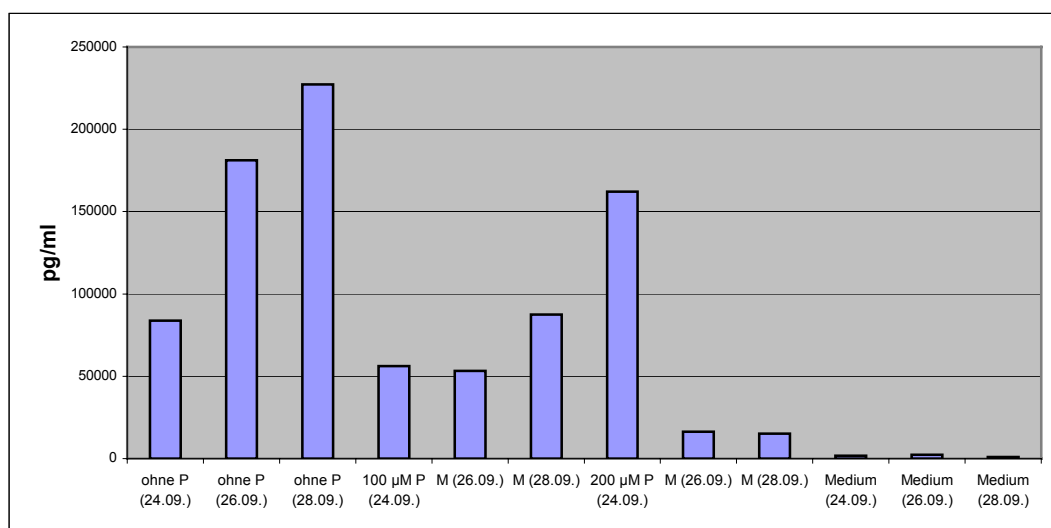


Abbildung 7.6: Inhibierung der HIV-Replikation durch Triaminopyrazol **66** bei einmaliger Zugabe in Konzentrationen von 100 μM , bzw. 200 μM über einen Zeitraum von sechs Tagen

Im zweiten Versuch wurde Triaminopyrazol, ebenfalls in Konzentrationen von 100, bzw. 200 μM , alle zwei Tage zu den Zellen gegeben. Abbildung 7.7 zeigt die Ergebnisse.

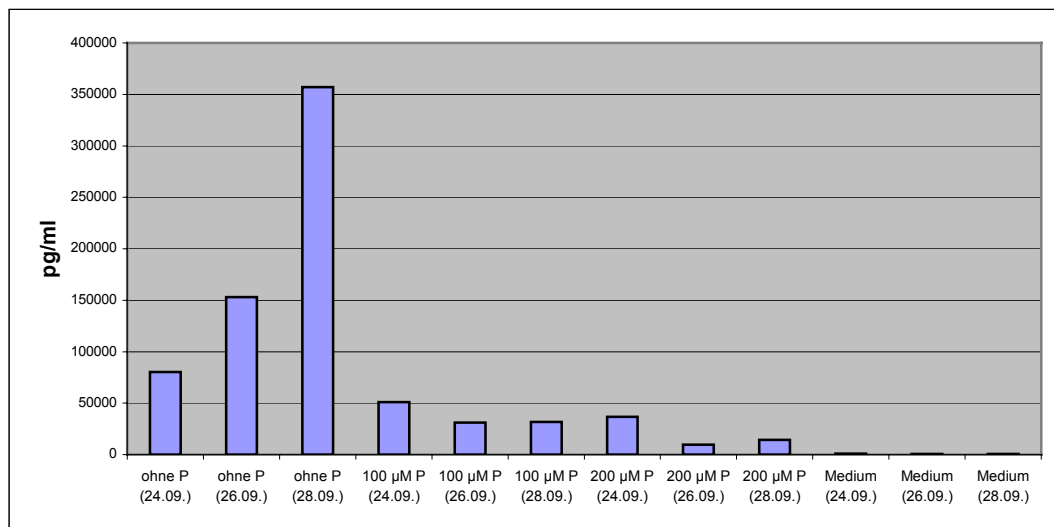


Abbildung 7.7: Inhibierung der HIV-Replikation durch Triaminopyrazol **66** bei dreimaliger Zugabe in Konzentrationen von 100 µM, bzw. 200 µM über einen Zeitraum von sechs Tagen

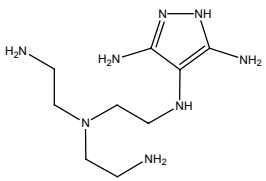
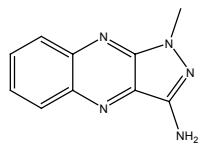
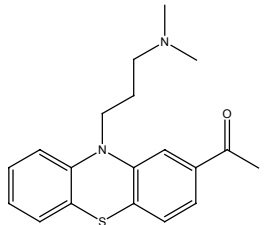
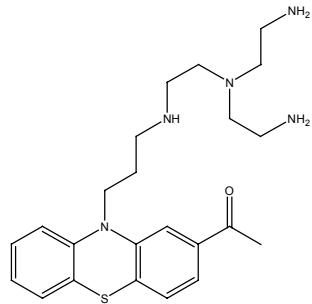
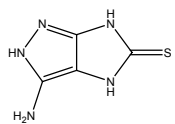
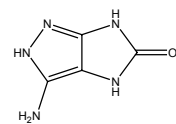
Es konnte hiermit gezeigt werden, dass unter beiden Versuchsbedingungen eine Inhibierung der Virus-Replikation möglich ist.

In naher Zukunft soll ein weiterer Assay entwickelt werden, in dem die β -gal Aktivität direkt über das tat-Peptid angeschaltet werden soll, d.h. es wäre nicht mehr nötig, den Virus zuzugeben. Sollten in diesem Assay die Ergebnisse wiederholt werden können, wäre dies der endgültige Beweis für eine Inhibierung der tat-TAR-Komplexbildung.

7.3 Zellkulturuntersuchungen weiterer Verbindungen

Einige weitere, im Rahmen dieser Arbeit synthetisierte Verbindungen wurden ebenfalls im beschriebenen *in vivo* Assay getestet. Die nachfolgende Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen. Auf eine Unterscheidung zwischen Entry, und post Entry-Hemmung, sowie auf Langzeitstudien wurde hier verzichtet.

Tabelle 7.1: IC₅₀-Werte der Verbindungen im Zellassay *in vivo*

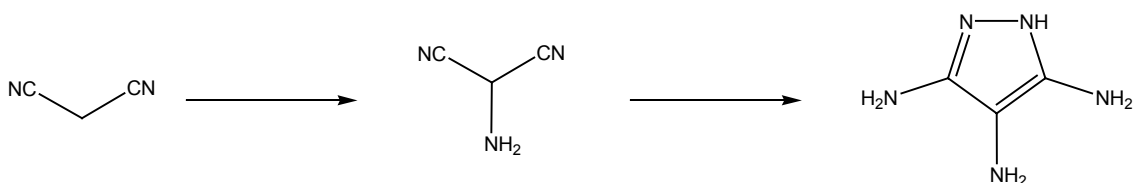
Verbindung	IC ₅₀ [μM]	Toxizität [μM]	Verbindung	IC ₅₀ [μM]	Toxizität [μM]
	500	n.b		500	n.b
	< 50	n.b		< 20	30-40
	< 200	n.b		100	n.b

Die Tendenzen der zuvor in dem FRET-Assay ermittelten IC₅₀-Werte der Verbindungen wiederholen sich auch in den Zellkulturexperimenten. Das Acetylpromazinderivat **108** zeigt auch hier den niedrigsten IC₅₀-Wert, jedoch liegt seine Toxizität nur etwas höher. Der beobachtete Effekt ist demnach nicht ausschließlich auf eine inhibitorische Wirkung zurückzuführen.

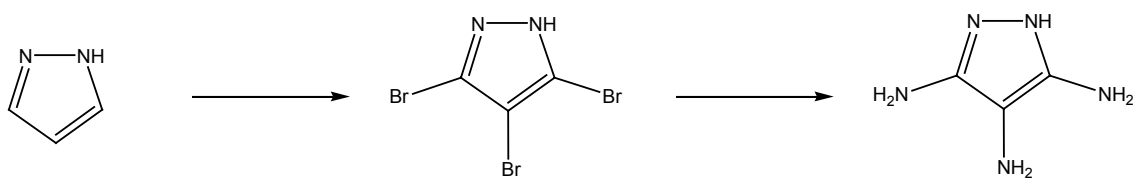
8 Zusammenfassung und Ausblick

8.1 Zusammenfassung

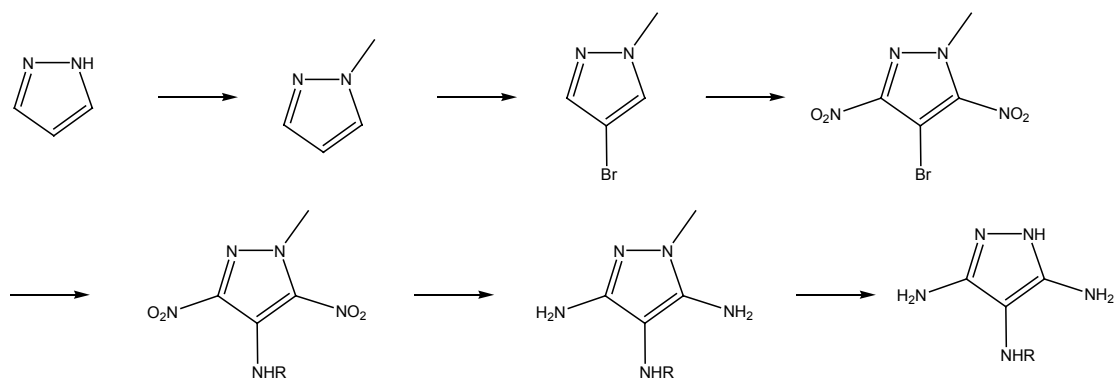
Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Liganden zu synthetisieren, die spezifische Bindungen mit der TAR-RNA aus HIV-1 eingehen. Durch eine solche Bindung ist es möglich, den viralen Replikationszyklus zu unterbrechen. Ausgehend von einem relativ rudimentären Design, basierend auf dem Arginin-Fork-Model von Frankel, gelang es, mit Triaminopyrazol **66** und verschiedenen seiner Derivaten dieses Ziel zu erreichen. Triaminopyrazole sind über verschiedene Synthesewege zugänglich. Die naheliegende Synthese durch Addition von Hydrazin an das HCN-Trimer scheiterte an der geringen Ausbeute.



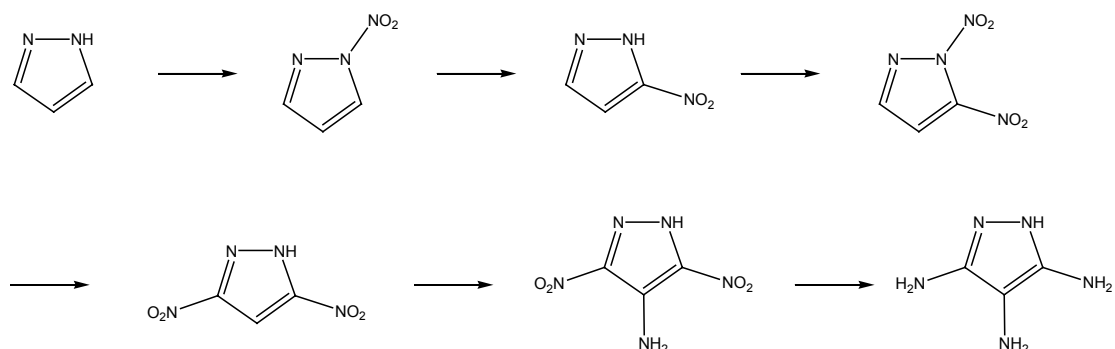
Ein schneller und ergiebiger Weg ist die Bromierung von Pyrazol, und die anschließende Umsetzung mit Ammoniak durch Ullmann-Reaktion.



Alternativ kann ein mehrstufiger Weg eingeschlagen werden, der den Vorteil größerer Flexibilität bietet. Hierbei wird 1-Methylpyrazol bromiert, nitriert und nucleophil substituiert. Reduktion und Demethylierung am Ring führen zu 4-Alkylaminoderivaten.

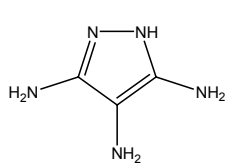
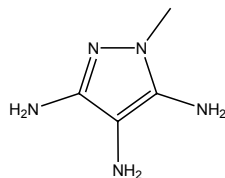
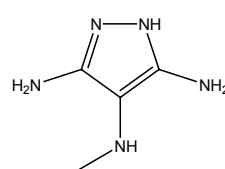
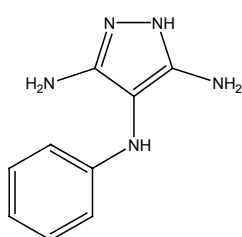
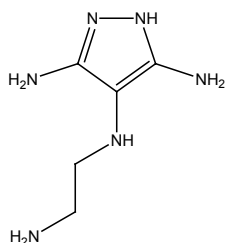
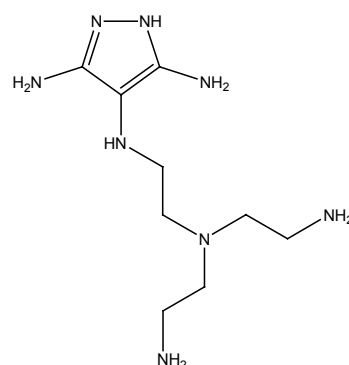


Unter modifizierten Bedingungen ist auch das methylfreie Analogon erhältlich. Jenes konnte auf diesem Weg in exzellenten Ausbeuten und ohne säulenchromatographische Aufreinigung hergestellt werden.



Nach erfolgreicher Synthese der Zielstrukturen wurden diese in einem FRET-Assay im Hinblick auf ihre Affinität zu der TAR-RNA getestet. 3,4,5-Triaminopyrazol übertraf trotz seiner geringen Größe und Ladung mit einem IC_{50} -Wert von 30 μM die Werte vieler tetrakationischer Tripeptide (FRET). Während diese Verbindung erheblich stärker als Argininamid an HIV-1 TAR bindet, dreht sich die Reihenfolge der Komplexstabilitäten bei HIV-2 TAR um. Erste NMR-Untersuchungen an Pyrazol-TAR-Komplexen wurden begonnen und zeigen, dass die bulge-Region die Bindungsstelle darstellt. 1-Methyl-3,4,5-triaminopyrazol **79a** sollte gemäß unserer Bindungshypothese nicht in die Tasche der RNA passen. Der ungefähr 20fach schlechtere IC_{50} -Wert der methylierten Verbindung steht durchaus in Einklang mit dieser Erwartung. Ebenso zeigt 1-*H*-3,5-Diamino-4-methylaminopyrazol **104** einen um den Faktor

9 schlechteren IC_{50} -Wert. Auch die weiteren synthetisierten Derivate zeigten geringere Werte (siehe Tabelle).

**66****79a****104****80a****80b****80c**

Verbindung	IC_{50} [μ M]	Verbindung	IC_{50} [μ M]
66	30	80a	120
79a	550	80b	170
104	270	80c	80

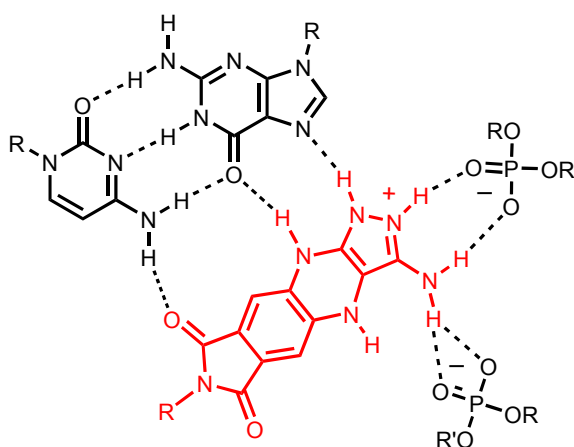
Nach erfolgreicher Bestimmung der TAR-Affinität von **66** wurde seine Wirkung auf HIV-infizierte Hela P4-Zellen untersucht, die ein Tat-TAR-kontrolliertes Reportergen exprimierten. Dabei zeigte **66** eine Inhibierung mit $IC_{50} = 50 \mu$ M. Bis zu einer Konzentration von 500μ M traten hierbei keine toxischen Effekte auf. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei Triaminopyrazol tatsächlich um einen tat-Antagonisten handelt. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von **66** nicht die eines Entryinhibitors ist, sondern dass die Verbindung in der Lage ist, die Zellmembran zu durchdringen.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es somit gelungen, neuartige Strukturen zu synthetisieren, die selektiv in einem niedrigen $\mu\text{molaren}$ Bereich an TAR binden und in einem Zellaassay die Virusreplikation unterdrücken.

8.2 Ausblick

Um die Bindungsaffinitäten der Triaminopyrazole noch weiter zu erhöhen, sollten diese chemisch so modifiziert werden, dass sie kupplungsfähige Monomerbausteine für die kombinatorische Chemie darstellen. Dadurch wäre es möglich, Liganden zu identifizieren, die in der Lage sind, in noch niedrigeren Konzentrationen den tat/TAR-Komplex zu inhibieren. Da in der Arbeitsgruppe Göbel tripeptidische Liganden gefunden wurden, die selektiv an den loop von TAR binden, könnte hier sicherlich über eine kovalente Verknüpfung beider Strukturen eine Erhöhung der Affinität erreicht werden.

In Erweiterung des Modells wird in folgenden Arbeiten versucht, Triaminopyrazol in größere, planare Struktur motive einzubauen. Erste Erfolge konnten hierbei schon erzielt werden. Bei einer weiteren Verlängerung des Moleküls wäre es möglich, eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zum Cytosin-39 aufzubauen. Dadurch sollte eine höhere Stabilität des TAR-Ligand-Komplexes erreicht werden.



9 Experimenteller Teil

9.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen

Dünnschichtchromatographie:

Als stationäre Phase wurden mit Kieselgel 60 F254 der Firma *Merck* beschichtete Aluminiumfolien verwendet. Die Verbindungen wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlängen 254 und 366 nm sichtbar gemacht. Die Laufstrecke betrug 3.5 – 4.5 cm. R_f – Werte wurden bei Kammerfüllung ermittelt.

Färbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie:

Zum Anfärben der DC-Spots wurden Ninhydrin- und KMnO_4 -Lösungen (Ninhydrin-Lösung: 3.75 g Ninhydrin in 50 ml *n*-Butanol/Aceton (v:v); KMnO_4 -Lösung: 3.00 g KMnO_4 , 20.00 g K_2CO_3 in 300 ml dest. H_2O + 5 ml 5 %-iger NaOH-Lösung) verwendet.

Präparative Säulenchromatographie:

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (0.04-0.063 mm) der Firma Merck verwendet.

Wasserfreie Lösungsmittel:

Tetrahydrofuran (THF) wurde über Aluminiumoxid (*ICN* Alumina N-Super I) vorgetrocknet und von Natrium / Benzophenon unter Argonatmosphäre abdestilliert. Alle anderen verwendeten Lösungsmittel wurden, wenn nicht anders erwähnt, durch Destillation über den üblichen Trockenmitteln erhalten.

Reagenzien und absolute Lösungsmittel:

Alle Reagenzien wurden von den Firmen *Fluka*, *Maybridge*, *Sigma-Aldrich* oder *Acros* bezogen und, wenn nicht anders beschrieben, ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Kernresonanzspektroskopie (NMR):

Aufnahmen von NMR-Spektren erfolgten an einem AM 250 der Firma *Bruker*. Die chemische Verschiebung δ wurde in ppm angegeben und auf das jeweilige deuterierte Lösungsmittel bezogen: DMSO- d_6 = 2.49 ppm; CDCl₃- d_1 = 7.23 ppm. Die Kopplungskonstanten J wurden in Hz angegeben. Die Feinstruktur wurde mit s für Singulett, bs für breites Singulett, d für Dublett, dd für Doppeldublett, t für Triplett sowie m für Multiplett bezeichnet. Alle Messungen erfolgten bei 300 K.

Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR):

Alle FT-IR-Spektren wurden mit Hilfe eines 420 Series der Firma *Jasco* aufgezeichnet. Die Banden wurden auf ganze Wellenzahlen ν gerundet. Die Intensitäten der Banden wurden mit s für stark, m für mittel und w für schwach bezeichnet. Feststoffe wurden mit Hilfe eines KBr-Presslings, Flüssigkeiten zwischen zwei NaCl-Fenstern gemessen.

UV-Messungen:

UV-Messungen wurden mit einem Varian Carey 1E aufgenommen. Die Quarzküvetten hatten ein Volumen von 1 ml und eine Schichtdicke von 1.00 cm.

Elementaranalysen:

Die Elementaranalysen wurden mit einem CHN Rapid der Firma Heraeus im Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Massenspektroskopie:

Die Massenspektren wurden im Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie der Universität in Frankfurt am Main gemessen. Für ESI-Spektren wurde ein VG Plattform II der Firma *Fisons*, für MALDI-TOF-Spektren ein TOF SPEC, ebenfalls von *Fisons*, verwendet.

Schmelzpunkte:

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte an einem Heiztisch nach *Kofler*, sowie einer Schmelzpunktapparatur vom Typ 9200 der Firma *Electrotherma*. Die Werte sind unkorrigiert.

Kristallstrukturanalysen:

Die Kristallstrukturen wurden im Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie an einem Siemens Smart Diffraktometer bei Temperaturen von $-118\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $-127\text{ }^{\circ}\text{C}$ gemessen.

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET):

FRET-Messungen wurden in 96-well Platten der Firma *Corning* mit non binding surface durchgeführt. Die Messung erfolgte mit einem Fluostar der Firma *BMG-Labtechnologie* bei einer Temperatur von $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Gaschromatographie:

Für die Gaschromatographie wurde ein HP 6890 Series Gas Chromatograph mit einem μ -EC-Detektor verwendet. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Softwareprogramm Chemstation[®]. Als Trennsäule diente die HP 19091Z-433 mit den Abmessungen 30 m x 250 μ m x 0.25 μ m. Das Trägergas war Helium.

Cyclovoltametrie:

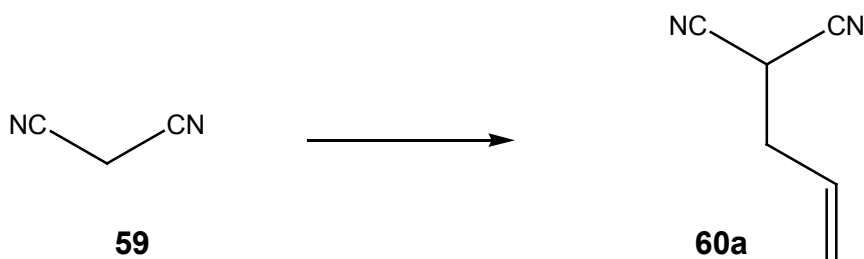
Die Cyclovoltametrie wurde am Institut für anorganische Chemie, Universität Frankfurt am Main, durchgeführt. Als Gegenelektrode dienten Ferrocen und eine Kalomelelektrode. Die Messungen wurden in Dichlormethan als Lösungsmittel durchgeführt.

Steriles Arbeiten:

Zur Vorbeugung einer Kontamination mit RNAsen wurden alle Experimente mit RNAs in sterilen Einmalgeräten oder autoklavierten Plastikerzeugnissen durchgeführt. Durch Behandlung von Milipore-Wasser mit 0.1 % (v/v) DEPC über Nacht bei Raumtemperatur und anschließendem Autoklavieren (30 Minuten bei 121 °C) wurde steriles Wasser generiert. Für RNA-Lösungen, Reaktionspuffer und Peptid-Lösungen wurde steriles Wasser (DEPC-behandelt) verwendet. Bei der Durchführung dieser Experimente wurden Latex-Einmalhandschuhe getragen.

9.2 Synthese von 4-Alkyl-3,5-Diaminopyrazolen

9.2.1 Synthese von Allylmalonsäuredinitril 60a



In einem ausgeheizten 250 ml Schlenkkolben wurden unter einem Argon-gegenstrom 10.00 g Malonsäuredinitril **59** (152 mmol) zusammen mit 6.60 ml Allylbromid (9.2 g, 76 mmol) und 2.25 g TBAI (6 mmol, 4 Mol-%) gegeben. Die entstandene Suspension wurde für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 21.01 g wasserfreies K₂CO₃ (152 mmol) unter Eiskühlung in kleinen Portionen hinzugegeben. Die dabei entstandene grüne Suspension wurde für weitere 20 min im Eisbad gerührt. Anschließend wurde für weitere 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden 150 ml dest. Wasser zugegeben und die wässrige Phase dreimal mit jeweils 100 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über MgSO₄ getrocknet und abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der so erhaltene braune Rückstand einer Vakuumdestillation (0.2 mbar, 65–76 °C) unterworfen. Man erhielt **60a** in Form eines leicht gelben Öls.

Ausbeute: 6.61 g (82 %)

R_f-Wert: 0.2 (EtOAc/Hexan, 8:1), färbt mit Ninhydrin beim Erwärmen

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 5.89-5.76 (m, 1H, =CH), 5.38-5.29 (m, 2H, =CH₂), 4.92 (t, J = 6.5 Hz, 1H, -CH), 2.75 (t, J = 6.7 Hz, 2H, -CH₂)

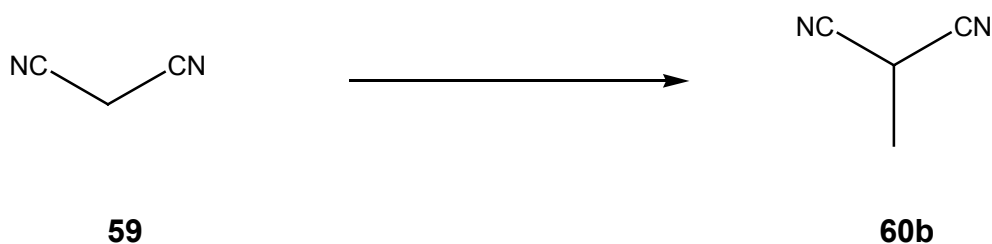
IR (NaCl, Film): ν = 3098 (m), 3015 (w), 2963 (m), 2923 (s), 2259 (m), 1879 (w), 1685 (w), 1645 (m), 1444 (m), 1420 (w), 1396 (w), 1303 (w), 1205 (w), 1132 (w), 1105 (w), 1024 (w), 991 (s), 938 (s), 892 (w), 824 (w), 723 (w)

Elementaranalyse (%) für C₆H₆N₂ (106.13):

Berechnet: C 67.90 H 5.70 N 26.40

Gefunden: C 67.66 H 5.87 N 26.28

9.2.2 Synthese von Methylmalonsäuredinitril 60b



In einem ausgeheizten 100 ml Schlenk Kolben wurden unter einem Argongegenstrom 5.02 g Malonsäuredinitril **59** (76 mmol) zusammen mit 2.37 ml Methyljodid (5.39 g, 38 mmol) und 2.25 g TBAI (6 mmol, 4 Mol-%) gegeben. Die entstandene Suspension wurde für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 10.50 g wasserfreies K₂CO₃ (76 mmol) unter Eiskühlung in kleinen Portionen hinzugegeben. Die dabei entstandene gelbe Suspension wurde für weitere 20 min im Eisbad gerührt. Anschließend wurde für weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden 75 ml dest. Wasser zugegeben und die wässrige Phase dreimal mit jeweils 50 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über MgSO₄ getrocknet und abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der so erhaltene braune Rückstand einer Vakuumdestillation (12 mbar, 79 - 81 °C) unterworfen. Man

erhielt eine leicht gelbes Öl von **60b**, welches ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt wurde.

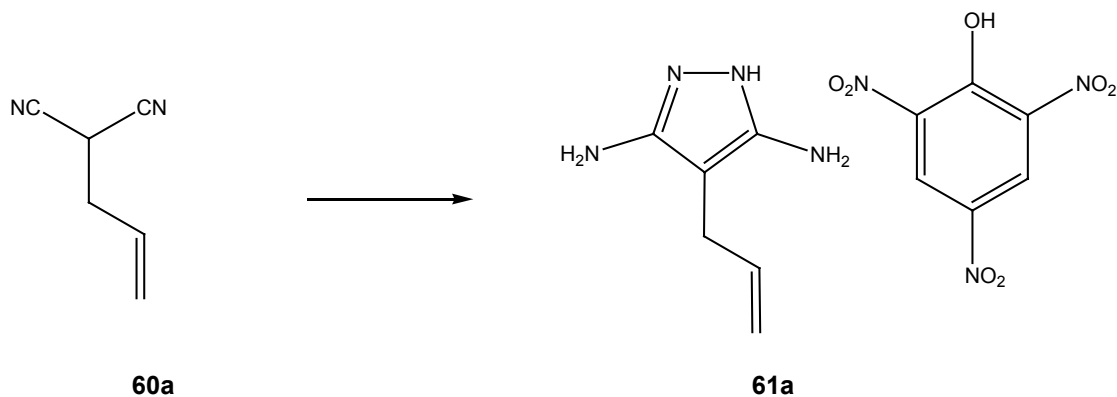
Ausbeute: 1.70 g (56 %)

R_f-Wert: 0.25 (EtOAc/Hexan, 8:1), färbt mit Ninhydrin beim Erwärmen

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 4.73-4.65 (q, J = 7.3 Hz, 1H, -CH), 4.38 (s, 2H, -CH₂, Malonsäuredinitril), 1.66-1.64 (d, J = 4.2 Hz, 3H, -CH₃),

IR (KBr): ν = 3653 (m), 3559 (w), 3274 (w), 3166 (w), 3012 (m), 2964 (s), 2926 (s), 2628 (w), 2518 (w), 2446 (w), 2398 (w), 2261 (s), 1624 (w), 1456 (s), 1395 (s), 1306 (s), 1265 (m), 1224 (w), 1123 (s), 1065 (s), 1016 (s), 982 (m), 935 (w), 908 (w), 892 (m), 783 (w), 735 (w), 704 (w), 664 (w), 568 (s)

9.2.3 Synthese von 4-Allyl-3,5-Diaminopyrazol **61a**



In einem ausgeheizten Zweihalskolben mit aufgesetztem Rückflusskühler wurden 4.00 g Allylmalonsäuredinitril **60a** (37 mmol) und 1.88 g Hydrazin-Monohydrat (1.83 ml, 37 mmol) in 75 ml abs. EtOH 7 h zum Sieden erhitzt. Nach Zugabe von weiteren 940 mg Hydrazinmonohydrat (0.92 ml, 18.50 mmol, 0.5 eq) wurde weitere 14 h refluxiert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhielt man ein zähes, braunes Öl. Dieses wurde in 50 ml EtOAc

aufgenommen und viermal mit je 25 ml dest. Wasser gewaschen um überschüssiges Hydrazin-Monohydrat zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde erneut im Vakuum entfernt und das so erhaltene braune Öl in wenig MeOH aufgenommen. Zu dieser Lösung wurde langsam eine Lösung von 15.30 g Pikrinsäure (40 mmol einer mit ~ 40 % Wasser angefeuchteten Suspension, 1.1 eq), gelöst in wenig warmem MeOH, zugetropft. Nach der Zugabe von einigen Tropfen dest. Wasser trübte sich die zuvor klare Lösung. Nach Auskristallisieren über Nacht bei 4 °C erhielt man braune, nadelförmige Kristalle. Diese wurden abfiltriert mit wenig kaltem dest. Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 9.86 g (73%)

R_f-Wert: 0.1 (CH₂Cl₂/MeOH 19:1), UV-aktiv

Smp.: 141-143 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.14 (br, 2H, Pyrazol-NH), 8.59 (s, 2H, ^{3,5}H -Pikrinsäure), 6.52 (br, 4H, -NH₂), 5.78-5.70 (m, 1H, =CH), 5.05-4.62 (m, 2H, =CH₂), 2.95 (d, J = 5.9 Hz, 2H, -CH₂)

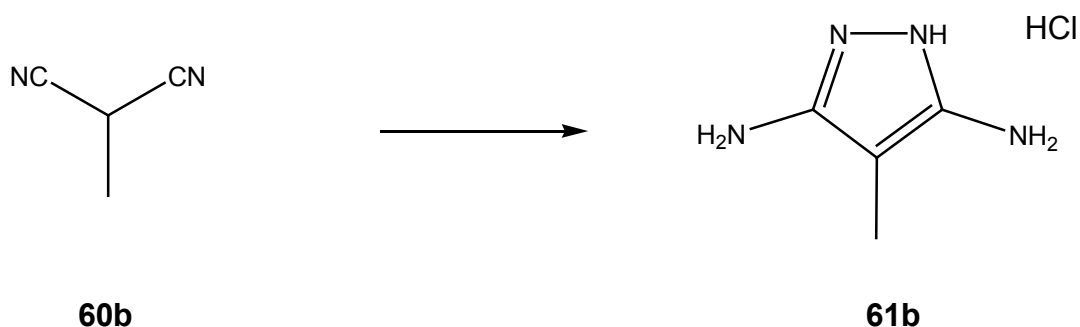
IR (KBr): ν = 3472 (m), 3375 (m), 3355 (m), 3275 (m), 3085 (m), 1642 (s), 1550 (s), 1478 (w), 1432 (w), 1364 (w), 1311 (m), 1294 (s), 1265 (m), 1153 (w), 1075 (w), 914 (m), 789 (m), 742 (w), 713 (m)

Elementaranalyse (%) für C₁₂H₁₃N₇O₇ (367.27):

Berechnet: C 39.24 H 3.57 N 26.70

Gefunden: C 39.33 H 3.80 N 26.80

9.2.4 Synthese von 4-Methyl-3,5-Diaminopyrazol 61b



In einem ausgeheizten Zweihalskolben mit aufgesetztem Rückflusskühler wurden 1.45 g **60b** (18.10 mmol) und 920 mg Hydrazin-Monohydrat (895 μ l, 18.10 mmol) in 20 ml abs. EtOH 10 h zum Sieden erhitzt. Nach Zugabe von weiteren 460 mg Hydrazinmonohydrat (448 μ l, 9.05 mmol, 0.5 eq) wurde weitere 18 h refluxiert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhielt man ein zähes, braunes Öl. Dieses wurde in 10 ml EtOAc aufgenommen und viermal mit je 5 ml dest. Wasser gewaschen um überschüssiges Hydrazin-Monohydrat zu entfernen. Das Lösungsmittel wurde erneut im Vakuum entfernt und das so erhaltene braune Öl in wenig MeOH aufgenommen. Zu dieser Lösung wurde langsam eine Lösung von 7.62 g Pikrinsäure (19.91 mmol einer mit ~ 40 % Wasser angefeuchteten Suspension, 1.1 eq), gelöst in wenig warmem MeOH, zugetropft. Nach der Zugabe von einigen Tropfen dest. Wasser trübte sich die zuvor klare Lösung. Nach Auskristallisieren über Nacht bei 4 °C erhielt man einen gelben Feststoff. Dieser wurden abfiltriert mit wenig kaltem dest. Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Anschließend wurde das Pikrat in wenig Methanol gelöst und über eine Ionen-Austauschssäule in sein Hydrochlorid überführt. Man erhielt braune Kristalle von **61b**.

Ausbeute: 1.80 g (67%)

R_f-Wert: 0.2 (CH₂Cl₂/MeOH 19:1), UV-aktiv, färbt mit Ninhydrin

Smp.: 126-127 °C

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ = 11.08 (br, 2H, Pyrazol-NH), 6.46 (br, 4H, -NH₂), 1.69 (s, 1H, -CH₃)

IR (KBr): ν = 3388 (s), 3200 (s), 1640 (s), 1576 (s), 1458 (m), 1390 (w), 952 (w), 782 (w), 727 (w), 672 (s)

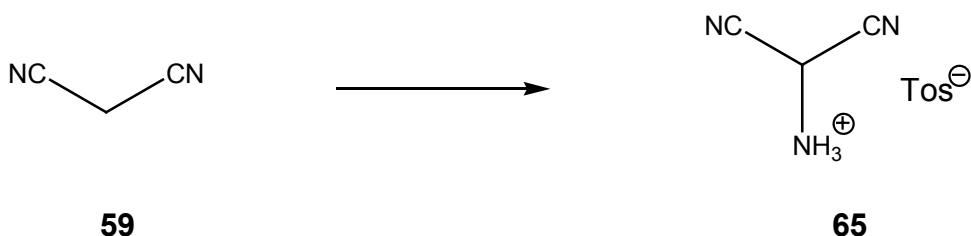
Elementaranalyse (%) für $\text{C}_4\text{H}_9\text{ClN}_4 \times 0.3 \text{ H}_2\text{O}$ (154.00):

Berechnet: C 31.20 H 6.28 N 36.38

Gefunden: C 31.42 H 6.28 N 36.49

9.3 Synthese von 3,4,5-Triaminopyrazol

9.3.1 Synthese von 2-Aminomalonsäuredinitril **65**



22.02 g Malonsäuredinitril (333 mmol) **59**, 23.00 g (333 mmol) NaNO₂ und 136.58 g Natriumacetat (1665 mmol, 5 eq) wurden in 500 ml dest. Wasser gelöst und mittels einer Eis-Kochsalz-Mischung auf – 20 °C abgekühlt. Daraufhin erfolgte unter kräftigem Rühren die tropfenweise Zugabe von 60 ml 6 molarer Schwefelsäure in dem Maß, dass die Temperatur nicht über 5 °C stieg. Nach erfolgter Zugabe wurde die Reaktionslösung über Nacht bei 4 °C stehen gelassen. Danach wurden 30 ml konzentrierter Schwefelsäure tropfenweise unter Rühren und starker Kühlung zugegeben. Die Lösung wurde anschließend viermal mit jeweils 100 ml Diethylether extrahiert und die vereinigten Extrakte langsam, bei 0 °C, zu 14.00 g amalgamierter Aluminiumfolie in 250 ml trockenem THF zugetropft. Anschließend wurden noch weitere 15 min gerührt. Nach vorsichtiger Zugabe von 25 ml dest. Wasser wurde die Lösung für 1 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde über Celite® abfiltriert und jeweils zweimal mit 100 ml Diethylether und 100 ml THF gewaschen. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck auf ca. 200 ml eingeeengt und mit 60.00 g (348 mmol) para-Toluolsulfonsäure, suspendiert in 300 ml Diethylether, versetzt. Durch die Zugabe von weiteren 500 ml Diethylether begannen sich aus der Lösung leicht braune Kristalle abzuscheiden. Zur Vervollständigung der Kristallisation wurde die Lösung über Nacht bei – 20 °C gelagert. Das entstandene kristalline Produkt wurde abfiltriert und mehrfach mit trockenem Diethylether gewaschen.

Ausbeute: 41.12 g (65 %)

R_f-Wert: 0.5 (EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH 40:20:1:1), färbt mit Ninhydrin beim Erwärmen

Smp.: 176–177 °C (Lit.: 175-176 °C)¹²³

IR (KBr): ν = 2911 (s), 2662 (s), 2266 (s), 2116 (w), 1926 (w), 1604 (s), 1555(m), 1498 (w), 1452 (w), 1402 (w), 1322 (w), 1212 (s), 1125 (s), 1054 (m), 1007 (s), 968 (w), 850 (w), 815 (s), 687 (s), 607 (m), 571 (s), 507 (s)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.58 (bs, 3H, -NH₃, austauschbar mit D₂O), 7.55 (d, 2H, J = 8.1, $H^{3,5}$ -Aryl), 7.16 (d, 2H, J = 8.3, $H^{2,6}$ -Aryl), 6.24 (bs, 1H, -CH), 2.29 (s, 3H, -CH₃)

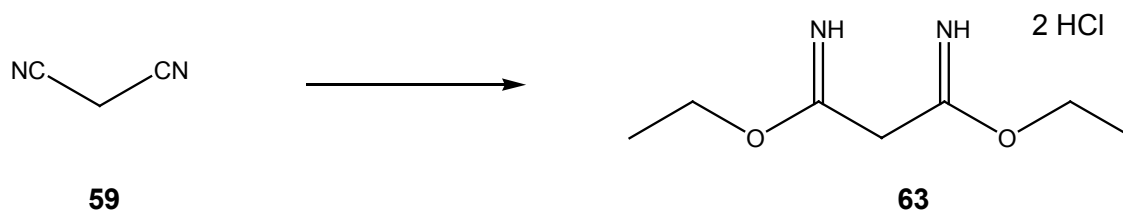
¹³C-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 145.2 (-C-SO₃-Aromat), 138.5 (-CH₃), 128.6 (-C^{3,5}-Aromat), 125.8 (-C^{2,6}-Aromat), 113.1 (-CN), 38.8 (-C-NH₃⁺), 21.1 (-CH₃-Aromat)

Elementaranalyse (%) für C₁₀H₁₁N₃O₃S x 0.3 H₂O (258.68):

Berechnet: C 46.43 H 4.52 N 16.24

Gefunden: C 46.58 H 4.21 N 15.95

9.3.2 Synthese von Diethyliminomalonat 63



Zu einer Lösung von 24.5 ml abs. Ethanol (400 mmol) in 500 ml Dioxan wurden über einen Zeitraum von 12 h 13.20 g Malonsäuredinitril (200 mmol) **59**, gelöst in 500 ml Dioxan, bei 0 °C zugetropft. Während dieses Zeitraums wurde ein

kontinuierlicher Strom HCl-Gas durch die Lösung geleitet. Danach ließ man noch 1 h, ohne weitere Zugabe von HCl, bei Raumtemperatur weiterrühren. Der entstandene farblose Niederschlag wurde abgesaugt und gründlich mit Diethylether gewaschen. Man erhielt das Dihydrochlorid von **63** in Form eines farblosen Pulvers.

Ausbeute: 46.23 g (100 %)

R_f-Wert: 0.21 (EE/MeOH 9:1), färbt mit Ninhydrin beim Erwärmen

Smp.: 128-129 °C (Lit.: 122 °C)¹²⁴

IR (KBr): ν = 2910 (s), 2752 (s), 2675 (s), 1735 (w), 1668 (s), 1579 (s), 1465 (m), 1442 (m), 1390 (s), 1357 (s), 1299 (w), 1207 (w), 1138 (m), 1097 (m), 1006 (m), 951 (m), 906 (m), 850 (w), 825 (m), 810 (m), 727 (w), 637 (m)

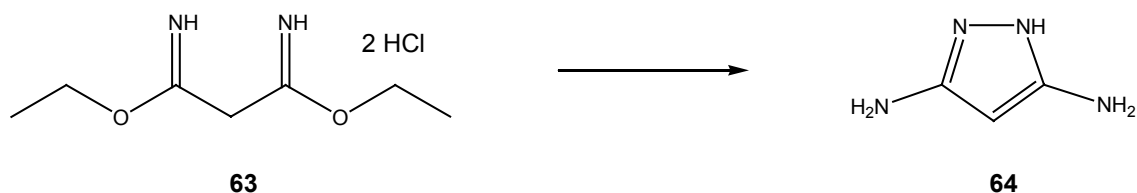
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 1.29 (t, 6H, -CH₃), 4.21-4.50 (m, 6H, Ethyl -CH₂, und -CH₂), 8.4 (b, 4H, -NH₂)

Elementaranalyse (%) für C₇H₁₆Cl₂N₂O₂ (231.12):

Berechnet: C 36.38 H 6.98 N 12.12

Gefunden: C 36.34 H 6.81 N 12.04

9.3.3 Synthese von 3,5-Diaminopyrazol **64**



40.00 g des Diimins (173 mmol) **63** wurden in 400 ml Diethylether suspendiert und so lange mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung versetzt bis sich zwei klare Phasen gebildet hatten. Die organische Phase wurde abgetrennt, die wässrige Phase mit NaCl gesättigt und zweimal mit jeweils 50 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organische Phasen wurden über NaSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhielt so 15.60 g der freien Base (100 mmol) in Form eines leicht gelben Öles. Dieses wurde zu 5.06 g Hydrazinhydrat (100 mmol, 4.91 ml) in 50 ml abs. Ethanol langsam zugetropft. Nach 5 min begann ein leicht brauner Feststoff aus der Lösung auszufallen. Daraufhin wurde für 1 h unter Eisbadkühlung bei 0 °C weitergerührt, um die Ausfällung zu vervollständigen. Der so erhaltene Feststoff wurde aus Isopropanol umkristallisiert, abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Man erhielt **64** als leicht braun-gelbe Kristalle.

Ausbeute: 8.74 g (89 %, ausgehend von der freien Base)

R_f-Wert: 0.1 (EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH 15:5:4:1), färbt mit Ninhydrin beim Erwärmen

Smp.: 109-110 °C (Lit.: 110 °C)¹²⁵

UV (H₂O): λ_{max} = 219 nm (ϵ = 11200)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.19 (b, 1H, Pyrazol-NH, austauschbar mit D₂O), 6.59 (b, 4H, -NH₂, austauschbar mit D₂O), 4.73 (s, 1H, Pyrazol-H⁴)

¹³C-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 154,11 (C^{3,5}-NH₂), 78,66 (C⁴-H)

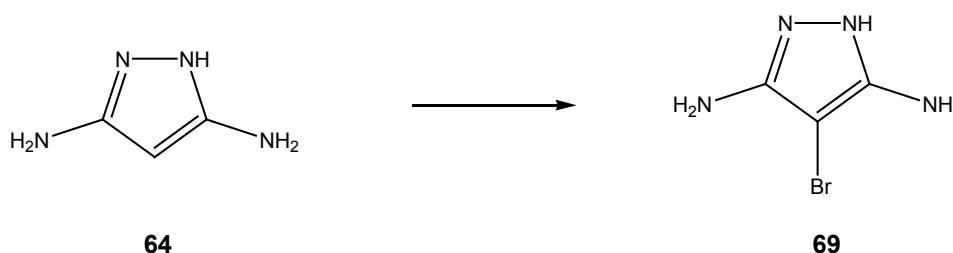
IR (KBr): ν = 3372 (s), 3192 (s), 2937 (m), 2362 (w), 1618 (s), 1588 (s), 1533 (s), 1499 (s), 1432 (s), 1365 (m), 1194 (m), 1071 (m), 997 (m), 734 (s)

Elementaranalyse (%) für C₃H₆N₄ (98.11):

Berechnet: C 36.73 H 6.16 N 57.11

Gefunden: C 36.72 H 6.24 N 56.99

9.3.4 Synthese von 4-Brom-3,5-diaminopyrazol **69**



980 mg Diaminopyrazol (10 mmol) **64** wurden in 50 ml dest. Wasser gelöst. Über einen Zeitraum von einer Stunde gab man bei Raumtemperatur 1.76 g Brom (0.565 ml, 11 mmol), gelöst in 150 ml dest. Wasser, durch langsames Zutropfen hinzu. Nach beendeter Zugabe wurde die Lösung für 30 min auf 80 °C erwärmt. Die nunmehr schwarze Lösung wurde mit 100 mg Aktivkohle versetzt und über Celite® abfiltriert. Die erhaltene, leicht gelbe Lösung, wurde anschließend mit Na₂CO₃ neutralisiert, und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene schwarz-braune Rückstand wurde nun dreimal mit je 50 ml Ethanol zum Sieden erhitzt und abfiltriert. Nach der Vereinigung der Ethanolauszüge wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene, gelbe Rückstand wurde aus Ethanol/Diethylether umkristallisiert. Man erhielt **69** in Form von braunen Kristallen.

Ausbeute: 1.34 g (75 %)

R_f-Wert: 0.2 (EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH 15:5:4:1), färbt mit Ninhydrin beim Erwärmen

Smp.: 133-134 °C (Lit.: 135-136 °C)¹²⁵

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.45 (b, 1H, Pyrazol - NH), 4.50 (b, 4H, -NH₂)

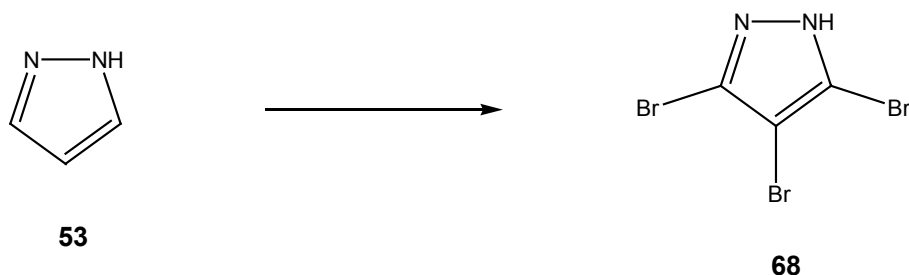
IR (KBr): ν = 3411 (s), 3373 (s), 3278 (m), 3149 (s), 1611 (s), 1499 (w), 1431 (m), 1342 (s), 1021 (w), 845 (s)

Elementaranalyse (%) für C₃H₅BrN₄ (170.00):

Berechnet: C 20.36 H 2.85 N 32.65

Gefunden: C 20.53 H 3.05 N 32.42

9.3.5 Synthese von 3,4,5-Tribrompyrazol **68**



Zu einer Lösung von 2.04 g Pyrazol (30 mmol) und 4.92 g NaOH (123 mmol) in 300 ml dest. Wasser wurden, über einen Zeitraum von einer Stunde, 14.7 g Brom (4.7 ml, 92 mmol) bei Raumtemperatur zugetropft. Die hierbei entstandene gelbe Lösung wird daraufhin für drei Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Anschließende Neutralisation mit 10 %-iger HCl-Lösung ergab einen weißen, voluminösen Niederschlag, der abgesaugt und gründlich mit kaltem Wasser gewaschen wurde. Umkristallisation aus Wasser/Ethanol (2:1) ergab **68** als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 7.42 g (78 %)

R_f-Wert: 0.7 (EtOAc/Hex 1:1)

Smp.: 188-189 °C (Lit. 187-188 °C)¹²⁶

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 14.80 (bs, 1H, Pyrazol-NH)

¹³C-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 97.97 (C⁴-Br)

IR (KBr): ν = 3098 (m), 3014 (m), 2936 (m), 2901 (m), 2861 (m), 2768 (m), 1527 (m), 1356 (s), 1137 (w), 1019 (m), 970 (s), 805 (w)

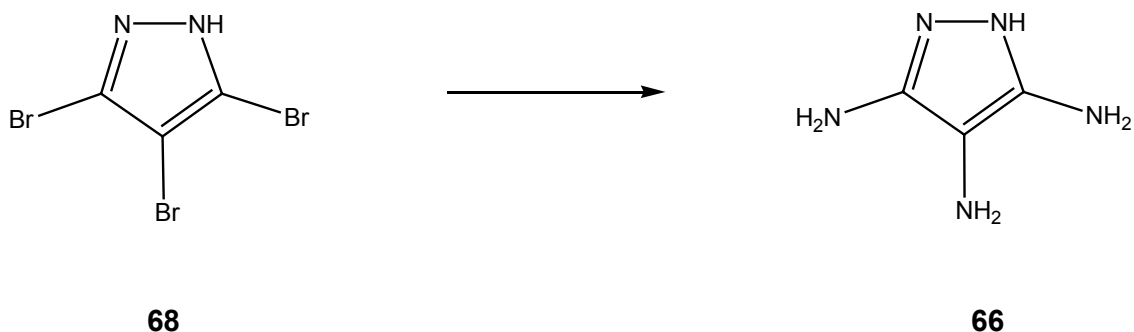
M ($\text{C}_3\text{HBr}_3\text{N}_2$): berechnet: 304.77; MS (ESI^-) m/z (%) = 300.6 (32.15%), 302.6 (100%), 304.5 (98.4%), 306.5 (31.64%), alle 4 möglichen Kombinationen der beiden Bromisotope

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_3\text{HBr}_3\text{N}_2$ (304.77):

Berechnet: C 11.82 H 0.33 N 9.19

Gefunden: C 12.01 H 0.57 N 8.96

9.3.6 Synthese von 3,4,5 – Triaminopyrazol **66**



In einem einseitig verschlossenen Quarzrohr wurden unter Stickstoffkühlung ca. 20 ml Ammoniak einkondensiert. Daraufhin wurden vorsichtig 4.00 g (13.12 mmol) Tribrompyrazol **68** und 400 mg CuCl hinzugegeben, das Quarzrohr in eine Druckapparatur eingebracht und diese verschlossen. Bei einer Temperatur von 40 °C stellte sich ein Druck von 25 bar ein. Man ließ 36 h bei dieser Temperatur und diesem Druck rühren, entlüftete dann und erhielt einen schwarzen Rückstand, der in 400 ml dest. Wasser aufgenommen wurde. Die Lösung wurde mit halbkonzentrierter Salzsäure auf pH 2 eingestellt.

Anschließend wurde für 30 min ein schwacher Strom von H₂S-Gas hindurchgeleitet. Die Lösung färbte sich hierbei tiefschwarz. Daraufhin wurde über Celite[®] von entstandenem CuS abfiltriert und das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Umkristallisation aus Wasser ergab **66** in Form weißer Mikrokristallite des Hydrochlorids.

Ausbeute: 1.26 g (85%)

R_f-Wert: 0.05 (EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH 15:5:4:1), färbt mit Ninhydrin beim Erwärmen

Smp.: 222-224 °C

UV (H₂O): λ_{max} = 241 nm

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.14 (bs, 2H, -NH, austauschbar mit D₂O), 7.52 (s, 2H, -NH₂, austauschbar mit D₂O), 7.38 (s, 2H, -NH₂, austauschbar mit D₂O), 7.18 (s, 2H, -NH₂, austauschbar mit D₂O)

IR (KBr): ν = 3448 (w), 1577 (s), 1420 (m), 1013 (w), 924 (w), 836 (w), 650 (w), 620 (w)

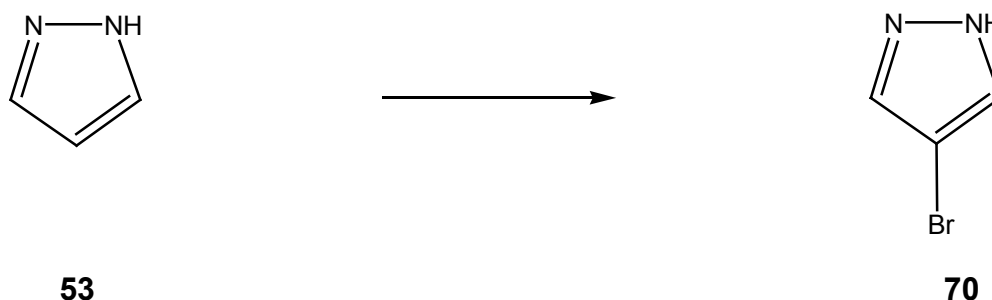
M (C₃H₇N₅): berechnet: 113.12; MS (ESI⁻) m/z (%) = 112.3 (100 %, M-H⁺)

Elementaranalyse (%) für C₃H₇N₅ (113.12):

Berechnet: C 31.85 H 6.24 N 61.91

Gefunden: C 0.71 H 0.73 N 0.00

9.3.7 Synthese von 4-Brompyrazol 70



Zu einer Lösung von 13.60 g (200 mmol) Pyrazol **53** in 50 ml Wasser wurden bei einer Temperatur von 0 °C langsam, tropfenweise 31.96 g (10.82 ml, 200 mmol) Brom hinzugegeben. Die Lösung färbte sich hierbei leicht gelb. Nach erfolgter Zugabe wurde für 30 min unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit 6 N wässriger NaOH neutralisiert. Der sich dabei abscheidende Feststoff wurde abfiltriert und mehrmals mit kaltem dest. Wasser gewaschen. Der erhaltene Rückstand wurde in 300 ml Diethylether aufgenommen, über Na₂SO₄ getrocknet und erneut abfiltriert. Das Filtrat wurde im Vakuum vom Lösungsmittel befreit, und der erhaltene Rückstand aus n-Hexan umkristallisiert. Man erhielt **70** in Form farbloser Kristalle.

Ausbeute: 26.73 g (91%)

R_f-Wert: 0.6 (EtOAc/Hex 1:5)

Smp.: 76-77 °C (Lit.: 76-77 °C)¹²⁷

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 13.2 (bs, 1H, -NH), 7.8 (s, 2H, -CH)

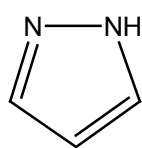
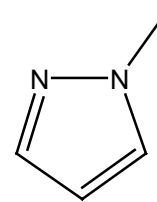
¹³C-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 133.9 (-C^{3,5}-H), 91.7 (-C⁴-Br)

IR (KBr): ν = 3852 (m), 3838 (m), 3734 (m), 3628 (m), 2984 (w), 2875 (w), 2812 (w), 1560 (w), 1491 (w), 1375 (s), 1335 (s), 1186 (m), 1141 (m), 1033 (s), 951 (s), 939 (s), 850 (m), 799 (s), 710 (m), 602 (m)

Elementaranalyse (%) für C₃H₃BrN₂ (146.97):

Berechnet: C 24.52 H 2.06 N 19.06

Gefunden: C 24.63 H 2.33 N 18.95

9.3.8 Synthese von 1-Methylpyrazol **75¹²⁸****53****75**

In einem 250 ml Rundkolben wurden 22.67 g (333 mmol) Pyrazol **53**, 37.34 g (666 mmol) fein zerstoßenes KOH und 5.94 g TBAB gegeben. Diese Mischung wurde für 30 min in ein Ultraschallbad gegeben um eine bessere Durchmischung der Reaktanden zu erhalten. Anschließend wurden bei einer Temperatur von 0 °C unter kräftigem Rühren vorsichtig 70.95 g (31.20 ml, 500 mmol) Mel zugetropft (Siedeverzüge!). Die so erhaltene Suspension wurde für 3 h bei 0 °C und anschließend für 12 h bei Raumtemperatur weitergerührt. Daraufhin wurde die halbfeste Mischung zunächst unter Normaldruck destilliert um überschüssiges Mel zu entfernen. Eine abschließende fraktionierte Vakuumdestillation (77–79 °C, 12 mbar) ergab **75** als farbloses Öl.

Ausbeute: 21.94 g (80%)**R_f-Wert:** 0.4 (EtOAc/Hex 1:10)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.66-7.65 (d, 1H, J = 2.1 Hz, -CH³), 7.42-7.41 (d, 1H, J = 1.5 Hz, -CH⁵), 6.23-6.22 (t, 1H, J = 2.0 Hz, -CH⁴), 3.84 (s, 3H, -N-CH₃)

^{13}C -NMR (250 MHz, DMSO- d_6): δ = 138.8 ($-\text{C}^3\text{H}$), 130.7 ($-\text{C}^5\text{H}$), 105.5 ($-\text{C}^4\text{H}$), 38.5 ($-\text{N}-\text{CH}_3$)

IR (NaCl, Film): ν = 3422 (s), 3118 (w), 2943 (m), 2364 (w), 2337 (w), 1654 (w), 1518 (s), 1399 (s), 1323 (w), 1279 (s), 1210 (m), 1092 (s), 1033 (m), 969 (m), 920 (w), 882 (w), 757 (s)

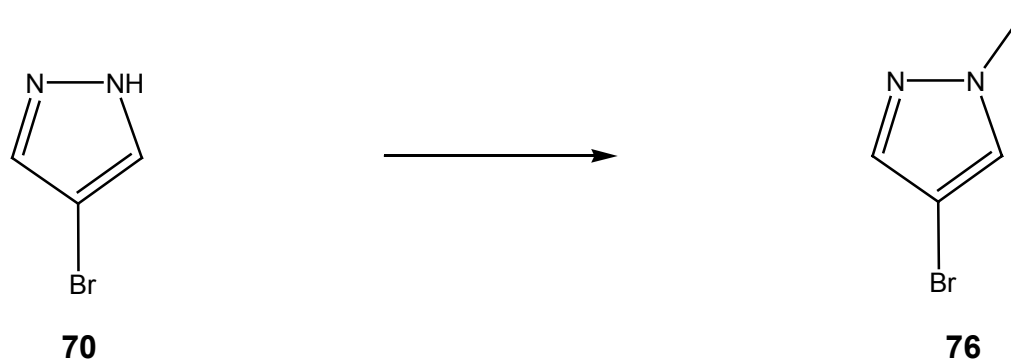
Elementaranalyse (%) für $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2$ (82.10):

Berechnet: C 58.51 H 7.37 N 34.12

Gefunden: C 58.36 H 7.31 N 34.26

9.3.9 Synthese von 4-Brom-1-methylpyrazol **76**

I.



24.98 g (170 mmol) 4-Brompyrazol **70**, 19.04 g (340 mmol) fein gemörsertes KOH und 4.40 g TBAB wurden zusammen in einen 250 ml Rundkolben gegeben und für 30 min in ein Ultraschallbad gegeben. Anschließend wurden bei einer Temperatur von 0 °C unter kräftigem Rühren vorsichtig 36.21 g (15.90 ml, 255 mmol) Mel zugetropft (Siedeverzüge!). Die Mischung ließ man für 24 h bei Raumtemperatur rühren. Daraufhin wurde die halbfeste Mischung zuerst unter Normaldruck destilliert um überschüssiges Mel zu entfernen. Die abschließende fraktionierte Vakuumdestillation (88-91 °C, 12 mbar, Lit.: 79-80 °C, 18 Torr¹²⁹) ergab **76** als leicht gelbliches Öl.

Ausbeute: 26.37 g (95%)

R_f-Wert: 0.45 (EtOAc/Hex 1:5)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.84 (s, 1H, -CH³), 7.48 (s, 1H, -CH⁵), 3.83 (s, 3H, -N-CH₃)

¹³C-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 139.2 (-C³H), 131.1 (-C⁵H), 91.7 (-C⁴-Br), 41.1 (-N-CH₃)

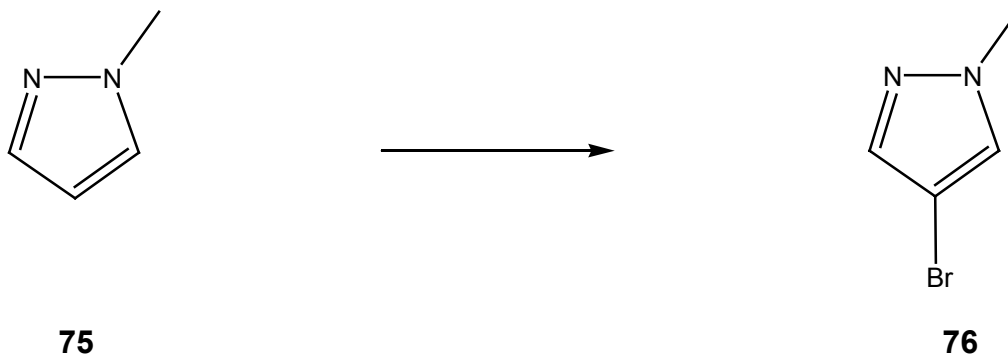
IR (NaCl, Film): ν = 3449 (s), 3130 (m), 2972 (w), 2940 (w), 1654 (s), 1522 (w), 1438 (m), 1416 (m), 1379 (m), 1322 (m), 1297 (m), 1284 (m), 1184 (w), 1116 (w), 980 (m), 954 (s), 840 (m), 795 (m), 698 (s)

Elementaranalyse (%) für C₄H₅BrN₂ (161.00):

Berechnet: C 29.84 H 3.13 N 17.40

Gefunden: C 29.79 H 3.21 N 17.17

II.



821 mg (10 mmol) N-Methylpyrazol **75** und 82.10 mg TBAB wurden in 20 ml dest. Wasser suspendiert. Unter Eiskühlung gab man tropfenweise 1.76 g (565 μ l, 11.00 mmol) Brom hinzu. Nach beendeter Zugabe wurde für 1 h bei Raumtemperatur weitergerührt. Anschließend wurde dreimal mit jeweils 15 ml EtOAc ausgeschüttelt, die organischen Phasen vereinigt und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der braune

Rückstand einer Vakuumdestillation (88-91 °C, 12 mbar, Lit.: 79-80 °C, 18 Torr) unterworfen. Man erhielt **76** als leicht gelbes Öl.

Ausbeute: 1.46 g (91%)

R_f-Wert: 0.45 (EtOAc/Hex 1:5)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.97 (s, 1H, -CH³), 7.61 (s, 1H, -CH⁵), 3.84 (s, 3H, -N-CH₃)

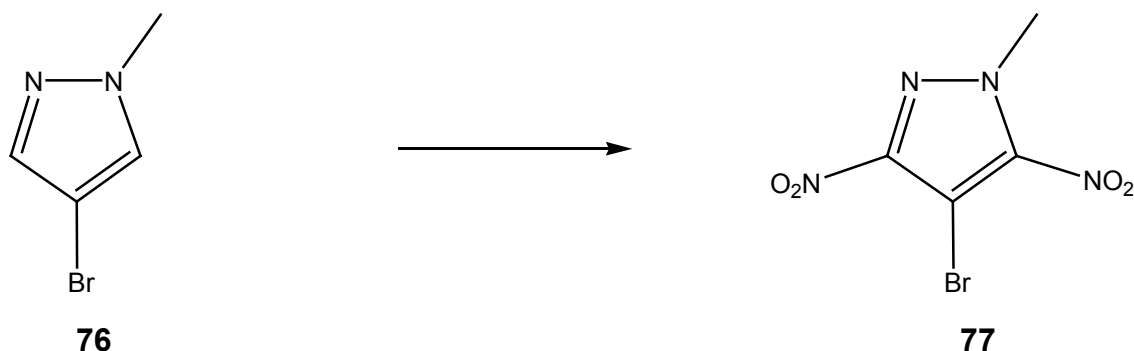
IR (KBr): ν = 3413 (w), 3155 (m), 2940 (m), 1564 (w), 1493 (w), 1375 (s), 1335 (s), 1278 (w), 1186 (m), 1141 (s), 1033 (s), 999 (w), 951 (s), 854 (s), 800 (s), 602 (s)

Elementaranalyse (%) für C₄H₅BrN₂ (161.00):

Berechnet: C 29.84 H 3.13 N 17.40

Gefunden: C 30.01 H 3.11 N 17.35

9.3.10 Synthese von 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitropyrazol **77**



50.00 g (311 mmol) 4-Brom-1-methylpyrazol **76** wurden bei 0 °C vorsichtig unter kräftigem Rühren zu einer Mischung aus 250 ml 100 %-iger HNO₃ und 260 ml konz. H₂SO₄ gegeben. Nach 30 min bei 0 °C wurde für 2 h unter

Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung auf 2 l Eiswasser gegeben, woraufhin ein weißer Feststoff ausfiel. Dieser wurde abgesaugt und fünfmal mit jeweils 100 ml kaltem Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen im Hochvakuum erhielt man **77** als weißes Pulver.

Ausbeute: 51.51 g (62%)

R_f-Wert: 0.55 (EtOAc/Hex 1:1)

Smp.: 110-112 °C (Lit.: 109-111 °C)¹³⁰

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 4.29 (s, 3H, -N-CH₃)

¹³C-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 149.9 (-C^{3,5}-NO₂), 90.9 (-C⁴-Br), 43.8 (-C-N-Me)

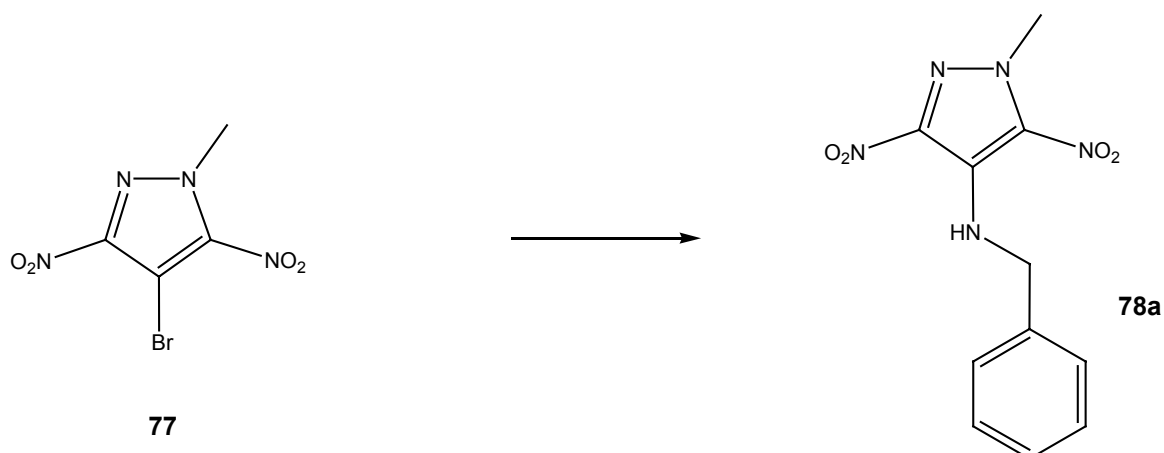
IR (KBr): ν = 2856 (w), 1567 (s), 1535 (m), 1498 (m), 1461 (w), 1424 (s), 1392 (w), 1366 (w), 1329 (s), 1297 (m), 1144 (w), 1081 (w), 1033 (m), 874 (s), 742 (w), 674 (w), 615 (w)

Elementaranalyse (%) für C₄H₃BrN₄O₄ (251.00):

Berechnet: C 19.14 H 1.20 N 22.32

Gefunden: C 19.17 H 1.40 N 22.10

9.3.11 Synthese von 4-Benzylamino-1-methyl-3,5-dinitropyrazol 78°



In einem Rundkolben wurden 3.01 g (12 mmol) **77** und 3.86 g (3.93 ml, 36 mmol) Benzylamin in 50 ml DMSO gelöst und für 3 h auf 100 °C erwärmt. Anschließend wurde die Lösung auf 100 g Eis gegeben, woraufhin ein gelber Feststoff ausfiel. Dieser wurde abfiltriert und aus EtOH umkristallisiert. Man erhielt **78a** in Form von gelben, nadelförmigen Kristallen.

Ausbeute: 2.53 g (76%)

Smp.: 114-116 °C

R_f-Wert: 0.3 (EtOAc/Hex 1:2)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.76-7.70 (t, 1H, J = 6.7 Hz, -NH), 7.33-7.19 (m, 5H, -Aromat), 4.68-4.65 (d, 2H, J = 6.7 Hz, -Benzyl-CH₂), 4.14 (s, 3H, -N-CH₃)

¹³C-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 141.1 (Pyrazol-C³-NO₂), 136.3 (-C¹-Aryl), 138.8 (Pyrazol-C⁵-NO₂), 128.6 (-C^{3,5}-Aryl), 128.5 (-C^{2,6}-Aryl), 127.2 (-C⁴-Aryl), 127.1 (Pyrazol-C⁴-NH), 48.2 (Benzyl-CH₂), 43.0 (-N-CH₃)

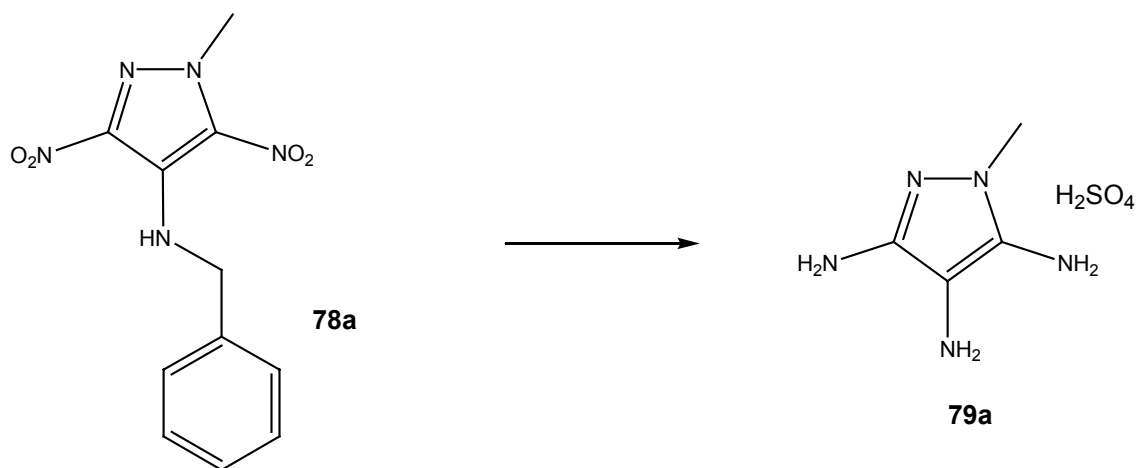
IR (KBr): ν = 3392 (m), 3360 (m), 1752 (w), 1613 (s), 1515 (s), 1484 (s), 1439 (s), 1406 (m), 1388 (m), 1315 (s), 1298 (s), 1069 (m), 896 (w), 833 (w), 783 (m), 758 (m), 702 (m), 525 (w), 483 (w)

Elementaranalyse (%) für $C_{11}H_{11}N_5O_4$ (277.24):

Berechnet: C 47.66 H 4.00 N 25.26

Gefunden: C 47.71 H 3.88 N 25.18

9.3.12 Synthese von 3,4,5-Triamino-1-methylpyrazol als Salz der Schwefelsäure **79a**



In einem zuvor mit Argon gespülten, einseitig verschlossenen Quarzrohr wurden 2.77 g (10 mmol) **78a** in 30 ml MeOH suspendiert und unter Argon mit 30 mg Pd/C versetzt. Das Quarzrohr wurde in eine Druckapparatur eingeführt, mehrmals mit Argon gespült und mit H_2 -Gas (40 bar) beschickt. Man ließ für 48 h bei 60 °C rühren, belüftete anschließend und filtrierte die nunmehr klare Lösung über Celite® in 10 ml halbkonzentrierte H_2SO_4 . Hierbei fiel sofort ein brauner Feststoff aus. Durch Zugabe von weiteren 150 ml MeOH und 200 ml Diethylether wurde die Ausfällung komplettiert. Man saugte ab und wusch zweimal mit 50 ml Diethylether nach. Der Rückstand wurde im Vakuum

getrocknet und anschließend aus wenig Wasser umkristallisiert. Man erhielt **66** als leicht braune Kristalle des Sulfats als Monohydrat.

Ausbeute: 1.49 g (66%)

R_f-Wert: 0.1 (EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH 15:5:4:1), färbt mit Ninhydrin beim Erwärmen

Smp.: 280-282 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.42 (bs, 8H, -NH₂ und -NH₃⁺, austauschbar mit D₂O), 3,86 (s, 3H, -N-CH₃)

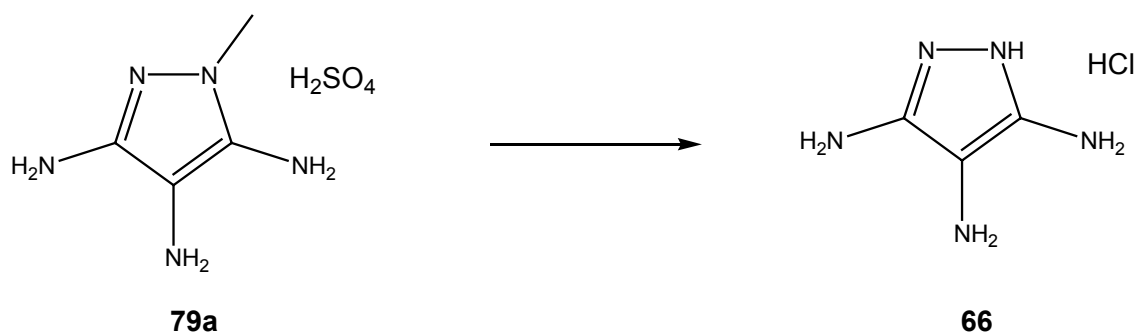
IR (KBr): ν = 3361 (s), 3162 (s), 1655 (s), 1580 (m), 1512 (m), 1309 (w), 1265 (w), 1059 (s), 973 (m), 694 (m), 607 (s)

Elementaranalyse (%) für C₄H₁₁N₅O₄S x 1 H₂O (243.24):

Berechnet: C 19.75 H 5.39 N 28.79

Gefunden: C 19.65 H 5.23 N 28.84

9.3.13 Synthese von 3,4,5-Triaminopyrazol **66** als Hydrochlorid



500 mg (2.22 mmol) **79a** und 2.37 g (20.5 mmol) Pyridiniumhydrochlorid wurden unter einer Argonatmosphäre für 3 h auf 210 °C erhitzt. Nach dem

Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der entstandene schwarze Feststoff in 25 ml Acetonitril aufgenommen und kurz zum Sieden erhitzt. Stehen lassen über Nacht bei 4 °C und Abfiltrieren des entstandenen Niederschlags ergaben **66** als ein farbloses Pulver.

Ausbeute: 69 mg (21%)

R_f-Wert: 0.1 (EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH 15:5:4:1), färbt mit Ninhydrin beim Erwärmen

Smp.: 223-226 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.14 (bs, 2H, -NH, austauschbar mit D₂O), 7.82 (s, 2H, -NH₂, austauschbar mit D₂O), 7.64 (s, 2H, -NH₂, austauschbar mit D₂O), 7.49 (s, 2H, -NH₂, austauschbar mit D₂O)

IR (KBr): ν = 3361 (s), 3162 (s), 1655 (s), 1580 (m), 1512 (m), 1309 (m), 1265 (m), 1059 (s), 974 (s), 694 (s), 608 (s)

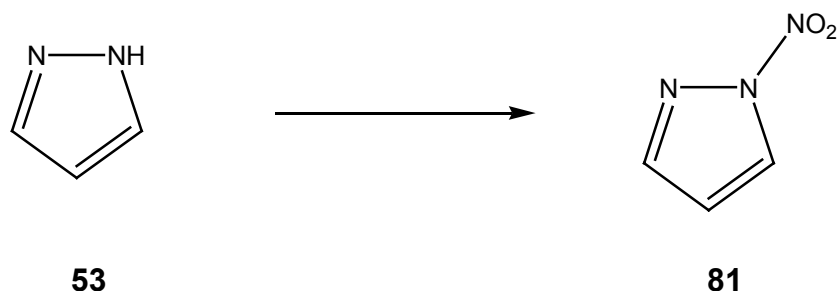
M (C₃H₇N₅): berechnet: 113.12; MS (ESI⁻) m/z (%) = 112.3 (100 %, M-H⁺)

Elementaranalyse (%) für C₃H₈ClN₅ (149.58):

Berechnet: C 24.09 H 5.36 N 46.82

Gefunden: C 25.04 H 3.33 N 0.85

9.3.14 Synthese von 1-Nitropyrazol **81**



In einem 250 ml Rundkolben wurden unter Eiskühlung 14.70 g (216 mmol) Pyrazol **53** in 45 ml Eisessig gelöst. Zu dieser Lösung gab man langsam tropfenweise 10.3 ml (230 mmol) 100 %-ige Salpetersäure. Hierbei bildete sich eine farblose Suspension. Nach erfolgter Zugabe wurden ebenfalls unter Eiskühlung bei 0 °C, 30 ml (317 mmol) Essigsäureanhydrid über einen Zeitraum von 2 h zugetropft. Nach beendeter Zugabe ließ man bei Raumtemperaturiterrühren bis die Lösung vollständig klar wurde. Anschließend gab man die Reaktionslösung auf 250 g Eis, wobei ein weißer, schaumartiger Niederschlag entstand. Dieser wurde abfiltriert und an der Luft getrocknet. Das Filtrat wurde mit NaHCO₃ neutralisiert und zweimal mit jeweils 50 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der weiße Feststoff wurde zusammen mit der ersten Ausfällung aus n-Hexan umkristallisiert. Die Kristalle wurden abfiltriert und an der Luft getrocknet. Man erhielt **81** in Form farbloser Kristalle.

Ausbeute: 24.40 g (100%)

R_f-Wert: 0.3 (EtOAC/Hex 1:8)

Smp.: 60-62 °C (Lit.: 60-61 °C)¹³¹

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ = 8.80-8.78 (d, 1H, J = 3 Hz, $-\text{H}^3$), 7.88-7.87 (d, 1H, J = 0.7 Hz, $-\text{H}^5$), 6.72-6.70 (t, 1H, J = 1.7 Hz, $-\text{H}^4$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ = 143.3 ($-\text{C}^3\text{-H}$), 125.5 ($-\text{C}^5\text{-H}$), 109.5 ($-\text{C}^4\text{-H}$)

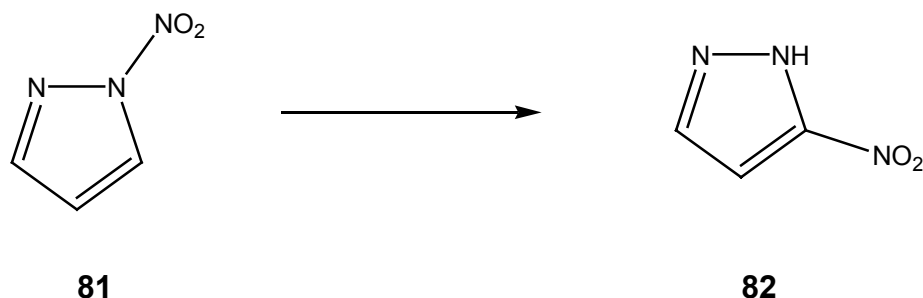
IR (KBr): ν = 3124 (s), 1792 (w), 1618 (s), 1529 (m), 1478 (w), 1406 (m), 1319 (s), 1289 (s), 1230 (m), 1163 (s), 1064 (s), 1028 (m), 938 (s), 904 (m), 848 (w), 819 (m), 776 (s), 738 (m), 630 (m), 562 (m)

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_3\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_2$ (113.07):

Berechnet: C 31.87 H 2.67 N 37.16

Gefunden: C 31.88 H 2.92 N 36.96

9.3.15 Synthese von 1H-3(5)-Nitropyrazol 82



23.41 g (207 mmol) N-Nitropyrazol wurden in 230 ml Benzonitril gelöst und für 2 h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur gab man die Lösung in 2 l n-Hexan, woraufhin sich ein gelblicher Niederschlag bildete. Dieser wurde abgesaugt, mit Hexan gewaschen und im Vakuum getrocknet. Zweimaliges Umkristallisieren aus Toluol ergab **82** in Form farbloser Kristalle.

Ausbeute: 23.41 g (100%)

R_f-Wert: 0.4 (EtOAc/Hex 1:3)

Smp.: 174-175 °C (Lit.: 173-174 °C)¹³²

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 13.94 (bs, 1H, -NH), 8.02-8.00 (d, 1H, J = 2.4 Hz, -H⁵), 7.02-7.01 (d, 1H, J = 2.0 Hz, -H⁴)

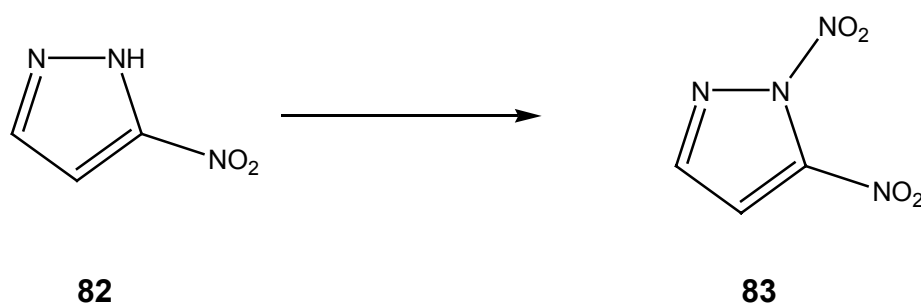
IR (KBr): ν = 3158 (s), 2926 (m), 1558 (s), 1515 (s), 1483 (m), 1423 (s), 1383 (s), 1352 (s), 1249 (m), 1209 (s), 1090 (m), 1048 (s), 990 (s), 928 (w), 824 (s), 785 (m), 755 (s), 612 (w)

Elementaranalyse (%) für C₃H₃N₃O₂ x 0.25 H₂O (117.58):

Berechnet: C 30.65 H 3.00 N 35.74

Gefunden: C 30.39 H 2.71 N 35.51

9.3.16 Synthese von 1,3-Dinitropyrazol 83



In einem 500 ml Rundkolben wurden unter Eiskühlung 22.70 g (201 mmol) Nitropyrazol **82** in 155 ml Eisessig gelöst. Zu dieser Lösung gab man langsam tropfenweise 20 ml (448 mmol) 100 %-ige Salpetersäure. Hierbei bildete sich eine weiße Suspension. Nach erfolgter Zugabe wurden, ebenfalls unter Eiskühlung bei 0 °C 55 ml (581 mmol) Essigsäureanhydrid über einen Zeitraum von 2 h zugetropft. Nach beendeter Zugabe ließ man bei Raumtemperaturiterrühren bis die Lösung vollständig klar wurde (ca. 1 h). Anschließend gab

man die Reaktionslösung auf 1000 ml Eiswasser, wobei ein weißer Niederschlag entstand. Dieser wurde abfiltriert und an der Luft getrocknet. Das Filtrat wurde mit NaHCO_3 neutralisiert und dreimal mit jeweils 250 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der weiße Feststoff wurde zusammen mit der ersten Ausfällung aus n-Hexan umkristallisiert. Die Kristalle wurden abfiltriert und an der Luft getrocknet. Man erhielt **83** in Form weißer Kristalle.

Ausbeute: 32.93 g (98%)

R_f-Wert: 0.3 (EtOAc/Hex 1:8)

Smp.: 67-69 °C (Lit.: 67 °C)¹³²

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 9.09-9.07 (d, 1H, J = 3.1 Hz, -H⁵), 7.44-7.43 (d, 1H, J = 3.1 Hz, -H⁴)

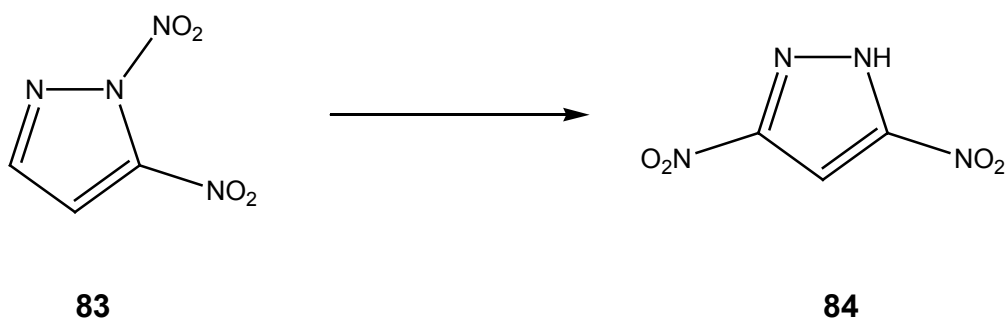
IR (KBr): ν = 3156 (s), 1638 (s), 1550 (s), 1516 (m), 1474 (w), 1436 (w), 1401 (s), 1285 (s), 1244 (s), 1117 (s), 1042 (s), 984 (s), 961 (m), 814 (s), 783 (s), 755 (s)

Elementaranalyse (%) für C₃H₂N₄O₄ (158.07):

Berechnet: C 22.79 H 1.28 N 35.44

Gefunden: C 22.84 H 1.41 N 35.25

9.3.17 Synthese von 3,5-Dinitropyrazol 84



6.90 g (44 mmol) **83** wurden in 70 ml Benzonitril gelöst und unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach 2 – 4 h (DC-Kontrolle !) wurde auf Raumtemperatur abgekühlt. Längere Reaktionsdauer führt durch Denitrierung zur vermehrten Bildung von 3(5)–Nitropyrazol. Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum am Kugelrohr (80–85 °C, 0.05 mbar) führen zu einem braunen Öl, welches langsam in der Kälte kristallisiert. Sublimation (150–170 °C, 0,1 mbar) ergab **84** in Form leicht gelber, nadelförmiger Kristalle.

Ausbeute: 6.64 g (95%)

R_f-Wert: 0.25 (EtOAc/MeOH 9:1)

Smp.: 172–173 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 13.86 (bs, 1H, -NH), 8.01 (s, 1H, -H⁴)

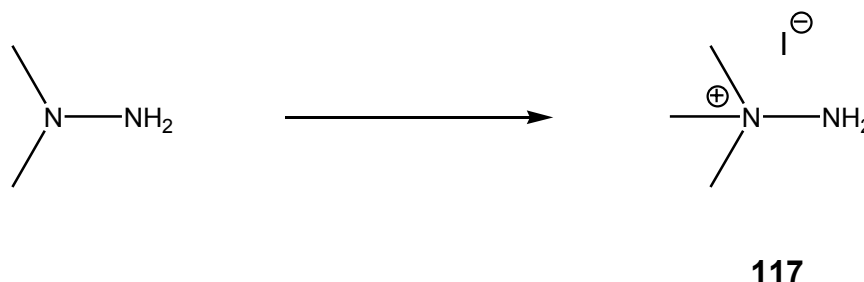
IR (KBr): ν = 3150 (s), 2641 (m), 2168 (w), 1916 (w), 1691 (w), 1569 (s), 1531 (s), 1479 (s), 1447 (s), 1368 (s), 1204 (s), 1083 (s), 1012 (m), 984 (s), 846 (m), 832 (m), 815 (m), 744 (m), 688 (w), 629 (w)

Elementaranalyse (%) für C₃H₂N₄O₄ (158.07):

Berechnet: C 22.79 H 1.28 N 35.44

Gefunden: C 22.95 H 1.51 N 35.25

9.3.18 Synthese von 1,1,1-Trimethylhydraziniumiodid **117**



Zu einer Lösung von 15.80 g (20 ml, 263 mmol) 1,1-Dimethylhydrazin in 240 ml THF gab man tropfenweise unter kräftigem Rühren und Eisbadkühlung 37.32 g (16.5 ml, 263 mmol) Methyljodid. Nach beendeter Zugabe wurde für 2 h bei Raumtemperatur weitergerührt, wobei eine weiße Suspension entstand. Diese wurde abfiltriert und aus EtOH umkristallisiert. Man erhielt **117** in Form weißer Kristalle.

Ausbeute: 49.47 g (93%)

R_f-Wert: 0.25 (EtOAc/MeOH 7:3)

Smp.: 233-235 °C (Zersetzung) (Lit.: 233-235 °C)¹³³

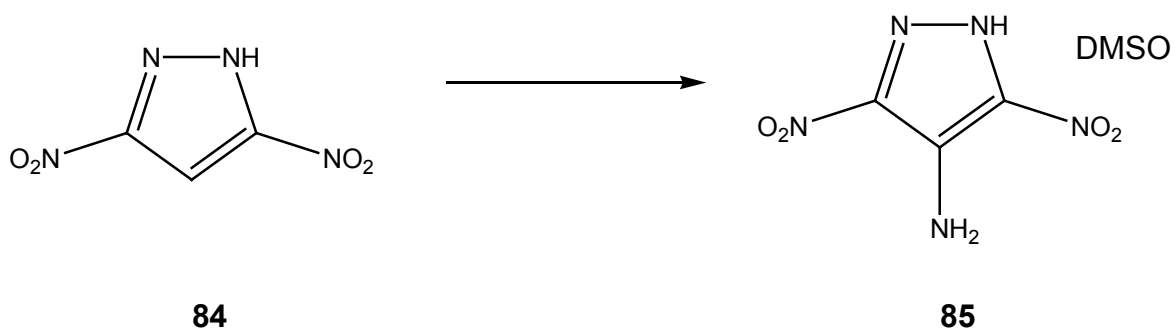
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 6.10 (bs, 2H, -NH₂), 3.30 (s, 9H, -N-CH₃)

IR (KBr): ν = 3282 (m), 3146 (m), 3012 (m), 1786 (w), 1607 (m), 1475 (m), 1392 (m), 1280 (w), 1141 (m), 1048 (s), 941 (s), 893 (s), 738 (m)

Elementaranalyse (%) für C₃H₁₁N₂I (202.04):

Berechnet: C 17.83 H 5.49 N 13.87

Gefunden: C 18.04 H 5.44 N 13.04

9.3.19 Synthese von 4-Amino-3,5-dinitropyrazol **85**

In einem 1000 ml Schlenkkolben wurden 22.13 g (140 mmol) 3,5-Dinitropyrazol **84** und 28.29 g (140 mmol) TMHI **117** in 600 ml trockenem DMSO gelöst. Zu dieser gelben Lösung gab man bei 0 °C 31.41 g (280 mmol, 2 eq) Kalium-*tert*-butanolat in einer Portion hinzu. Die Lösung verfärbte sich sofort nach tiefrot und die Entwicklung von Trimethylamin war zu beobachten. Man ließ für 4 h bei 0 °C weiterrühren. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf 600 g Eis gegeben. Nach dem Auftauen des Eises wurde vorsichtig mit konzentrierter Salzsäure auf pH 3 eingestellt, wobei ein goldbrauner Niederschlag entstand, der abfiltriert, mit wenig Eiswasser gewaschen und im Vakuum getrocknet wurde. Umkristallisation aus Acetonitril ergab das Mono-DMSO Solvat von **85** als rot-gelbe Kristalle. Erneutes Umkristallisieren aus Wasser ergaben das Monohydrat von **85** in Form goldgelber Kristalle.

Ausbeute: 32.08 g (91%) (DMSO-Monosolvat)

R_f-Wert: 0.5 (EtOAc/MeOH 9:1)

Smp.: 160-162 °C (Zersetzung) für das DMSO-Monosolvat

175-178 °C (Zersetzung) für das H₂O-Monosolvat

(Lit.: 160-162 °C, für das DMSO-Monosolvat; 175-178 °C, für das H₂O-Monosolvat)¹³⁴

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 9.30 (bs, 1H, -NH), 7.13 (bs, 2H, -NH₂)

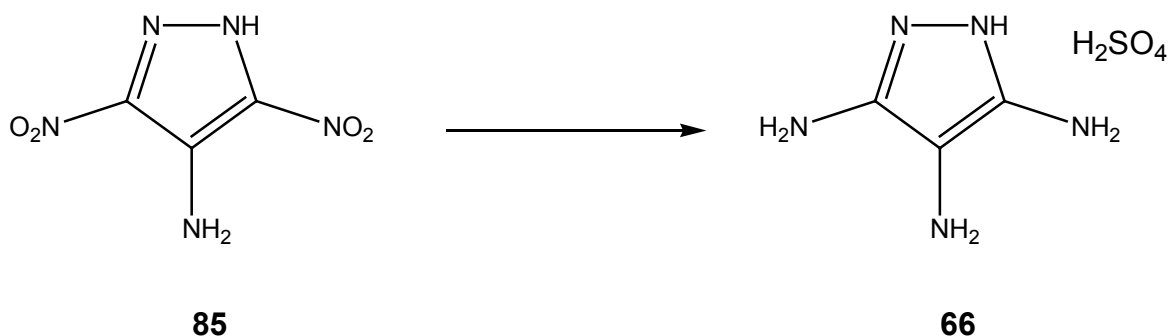
IR (KBr): ν = 3449 (s), 3253 (m), 3204 (m), 3005 (w), 2362 (w), 1824 (w), 1639 (s), 1565 (w), 1467 (s), 1307 (s), 1137 (m), 1086 (m), 1017 (s), 927 (m), 829 (m), 759 (m), 722 (m), 670 (w), 645 (w)

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_5\text{O}_5\text{S}$ (251.22):

Berechnet: C 23.90 H 3.61 N 27.88

Gefunden: C 23.98 H 3.56 N 27.64

9.3.20 Synthese von 3,4,5-Triaminopyrazol 66



In einem zuvor mit Argon gespülten, einseitig verschlossenen Quarzrohr wurden 4.00 g (23.1 mmol) **85** in 40 ml MeOH suspendiert. Zu dieser Suspension wurden unter Argon 400 mg Pd auf Aktivkohle gegeben. Der Quarzzylinder wurde in eine Druckapparatur gegeben und verschlossen. Nach dreimaligen spülen der Apparatur mit Argon, wurde mit Wasserstoffgas ein Druck von 40 bar aufgebaut. Nach Rühren für 48 h bei 60 °C wurde die Apparatur entlüftet, die Lösung über Celite® auf 10 ml halbkonzentrierte H_2SO_4 abfiltriert und mit 300 ml MeOH nachgespült. Hierbei fiel aus der Lösung ein brauner Niederschlag aus. Durch die Zugabe von 400 ml Diethylether und darauffolgenden stehen lassen über Nacht bei 4 °C vervollständigte sich die

Ausfällung. Der Niederschlag wurde abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Zweimaliges Umkristallisieren aus wenig Wasser ergab das Sulfatsalz von **66**.

Ausbeute: 3.85 g (79%)

R_f-Wert: 0.05 (EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH 15:5:4:1), färbt mit Ninhydrin beim Erwärmen

Smp.: 222-228 °C (Zersetzung)

UV (H₂O): λ_{max} = 241 nm

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.82 (s, 2H, -NH₂, austauschbar mit D₂O), 7.32 (s, 2H, -NH₂, austauschbar mit D₂O), 7.13 (s, 2H, -NH₂, austauschbar mit D₂O), 4.54 (bs, 2H, -NH, austauschbar mit D₂O)

IR (KBr): ν = 3360 (s), 3162 (s), 1655 (s), 1580 (s), 1512 (s), 1309 (m), 1265 (m), 1059 (s), 974 (s), 964 (m), 608 (s)

M (C₃H₇N₅): berechnet: 113.12; MS (ESI⁺) m/z (%) = 113.8 (100 %, M+H⁺)

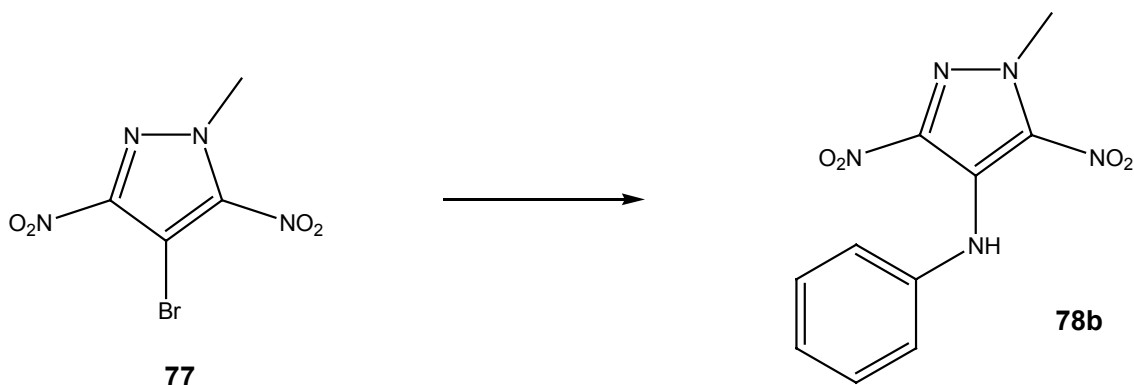
Elementaranalyse (%) für C₃H₉N₅O₄S (211.20):

Berechnet: C 17.06 H 4.30 N 33.16

Gefunden: C 11.06 H 1.25 N 7.56

9.4 Synthese von Derivaten des 3,4,5-Triaminopyrazols

9.4.1 Synthese von 1-Methyl-3,5-dinitro-4-phenylaminopyrazol **78b**



In einem Rundkolben wurden 2.51 g (10 mmol) **77** und 2.79 g (2.73 ml, 30 mmol) Anilin in 40 ml DMSO gelöst und für 6 h auf 100 °C erwärmt. Durch Zugabe von 100 ml Eiswasser fiel ein gelber Feststoff aus, der abfiltriert wurde und an 30 g Kieselgel adsorbiert wurde. Dieses Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (Hexan/EtOAc 2:1) zu einem gelben Feststoff aufgereinigt, der, aus EtOH umkristallisiert, **78b** in Form gelber Kristalle ergab.

Ausbeute: 2.29 g (87%)

R_f-Wert: 0.6 (EtOAc/Hex 1:5)

Smp.: 156-157 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.94 (s, 1H, -NH), 7.27-7.21 (m, 2H, -H^{3,5}-Aryl), 7.00-6.94 (m, 3H, -H^{2,4,6}-Aryl), 4.28 (s, 3H, -N-CH₃)

¹³C-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 143.5 (Pyrazol-C⁴), 141.6 (Pyrazol-C^{3,5}), 128.9 (-C¹-Aryl), 122.6 (-C^{3,5}-Aryl), 121.9 (-C^{2,6}-Aryl), 118.0 (-C⁴-Aryl), 43.5 (-N-CH₃)

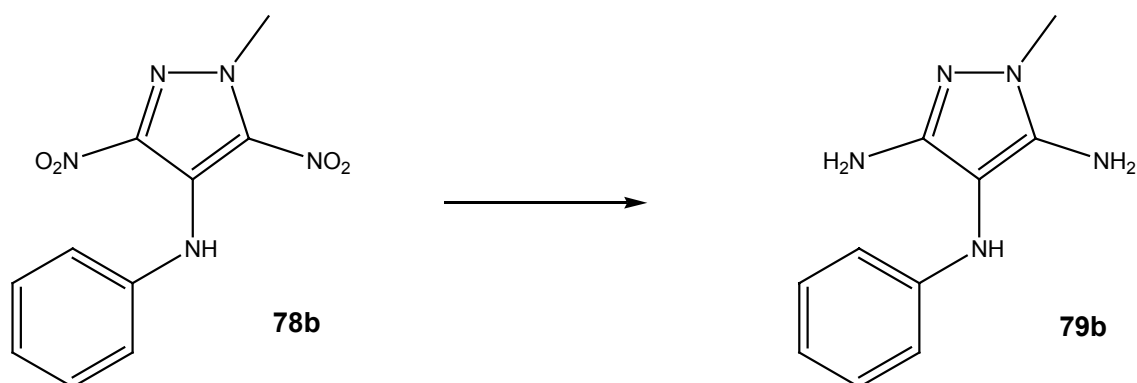
IR (KBr): ν = 3328 (m), 1587 (s), 1511 (m), 1485 (s), 1454 (w), 1436 (m), 1384 (m), 1359 (m), 1317 (s), 1306 (s), 1236 (w), 1115 (w), 1059 (m), 905 (w), 868 (w), 844 (w), 824 (m), 799 (m), 752 (m), 744 (w), 707 (w), 696 (m)

Elementaranalyse (%) für C₆H₆N₂ (106.13):

Berechnet: C 45.63 H 3.45 N 26.61

Gefunden: C 45.65 H 3.46 N 26.49

9.4.2 Synthese von 3,5-Diamino-1-methyl-4-phenylaminopyrazol **79b**



In einem zuvor mit Argon gespülten, einseitig verschlossenen Quarzrohr wurden 4.60 g (17.5 mmol) **78b** in 55 ml MeOH suspendiert und unter Argon mit 460 mg Pd/C versetzt. Das Quarzrohr wurde in eine Druckapparatur eingeführt, dreimal mit Argon gespült und mit H₂-Gas (40 bar) beschickt. Man ließ für 16 h bei 60 °C rühren, belüftete anschließend, filtrierte die nunmehr klare Lösung über Celite[®] ab und wusch gründlich mit MeOH nach. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, und der braune, ölige Rückstand säulenchromatographisch (EtOAc/Hexan 9:1) aufgereinigt. Man erhielt **79b** als braunes Pulver.

Ausbeute: 2.24 g (62%)

R_f-Wert: 0.3 (EtOAc/Hexan 9:1)

Smp.: 129-130 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.08-7.01 (m, 2H, -H^{3,5}-Aryl), 6.56-6.53 (m, 3H, -H^{2,4,6}-Aryl), 6.50 (s, 1H, -NH), 4.63 (s, 2H, -C³-NH₂), 3.89 (s, 2H, -C⁵-NH₂), 3.34 (s, 3H, -N-CH₃)

¹³C-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 150.5 (Pyrazol-C⁵), 149.3 (-C¹-Aryl), 143.3 (Pyrazol-C³), 129.0 (-C^{3,5}-Aryl), 116.3 (-C⁴-Aryl), 112.8 (-C^{2,6}-Aryl), 91.9 (Pyrazol-C⁴), 34.2 (-N-CH₃)

IR (KBr): ν = 3402 (m), 3369 (m), 3333 (m), 3159 (w), 1628 (s), 1600 (s), 1554 (m), 1519 (s), 1500 (s), 1439 (w), 1421 (m), 1335 (s), 1260 (w), 1175 (w), 1101 (w), 1018 (w), 993 (w), 757 (s), 716 (w), 697 (m), 649 (w), 620 (w), 508 (w)

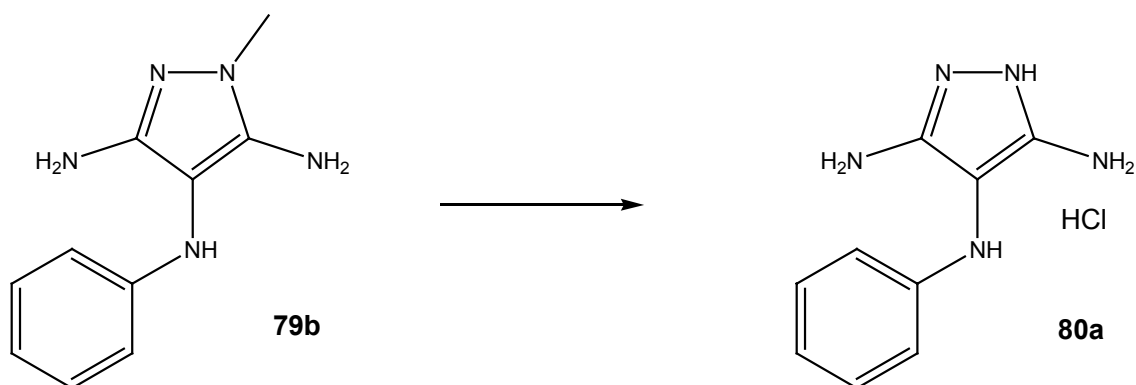
M (C₁₀H₁₃N₅): berechnet: 203.24; MS (ESI⁺) m/z (%) = 203.8 (100 %, M+H⁺)

Elementaranalyse (%) für C₁₀H₁₃N₅ (203.24):

Berechnet: C 59.10 H 6.45 N 34.46

Gefunden: C 58.84 H 6.42 N 34.18

9.4.3 Synthese von 1-*H*-3,5-Diamino-4-phenylaminopyrazol 80a



In einem Rundkolben wurden 2.56 g (12.6 mmol) **79b** und 14.56 g (126 mmol) Pyridiniumhydrochlorid für 7 h unter einer Argonatmosphäre auf 200 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der schwarze Rückstand in 100 ml MeOH aufgenommen und an Kieselgel adsorbiert. Säulenchromatographische Aufreinigung (EtOAc/EtOH/H₂O/HOAc 20:2:2:1) ergab das Hydrochlorid von **80a** als braunes Pulver.

Ausbeute: 655 mg (23%)

R_f-Wert: 0.4 (EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH 15:5:4:1), färbt mit Ninhydrin beim Erwärmen

Smp.: 104-105 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 9.52 (bs, 1H, Pyrazol-NH), 7.18-7.15 (m, 2H, -H^{3,5}-Aryl), 6.62-6.59 (m, 3H, -H^{2,4,6}-Aryl), 5.90 (s, 1H, -NH), 4.63 (s, 2H, -C³-NH₂), 3.89 (s, 2H, -C⁵-NH₂)

IR (KBr): ν = 3394 (m), 3335 (m), 3311 (s), 1625 (s), 1590 (s), 1543 (m), 1508 (s), 1412 (m), 1390 (s), 1367 (s), 1329 (m), 1310 (m), 1254 (m), 1210 (w), 1178 (w), 1082 (w), 1045 (w), 992 (w), 899 (w), 869 (w), 845 (w), 782 (w), 750 (m), 697 (m)

M (C₉H₁₁N₅): berechnet: 189.22; MS (ESI⁺) m/z (%) = 190.0 (100 %, M+H⁺)

9.4.4 Synthese von (2-Amino-ethyl)-carbaminsäure-*tert*-butylester **118**¹³⁵

24.03 g (27.2 ml, 400 mmol) Ethylendiamin wurden in 400 ml CHCl₃ gelöst. Zu dieser Lösung wurden dann unter Rühren 8.73 g (40 mmol) Boc₂O, gelöst in 200 ml CH₃Cl, bei 0 °C über einen Zeitraum von 3 h zugetropft. Daraufhin ließ man die Lösung langsam auf Raumtemperatur kommen und für weitere 16 h rühren. Anschließend wurde die organische Phase sechsmal mit jeweils 100 ml dest. Wasser gewaschen, dann weitere zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und abfiltriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhielt man **118** als farbloses Öl.

Ausbeute: 6.41 g (100%), bezogen auf Boc₂O

R_f-Wert: 0.6 (Isopropanol/H₂O/NH₃ 7:2:1) färbt mit Ninhydrin nach dem Erwärmen

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 6.73 (bs, 1H, -NH), 3.12-3.05 (q, 2H, J = 6.0 Hz, -Methylen-H²), 2.55-2.53 (t, 2H, J = 6.3 Hz, -Methylen-H¹), 1.38 (bs, 9H, -tBu-CH₃ und 2H, -NH₂)

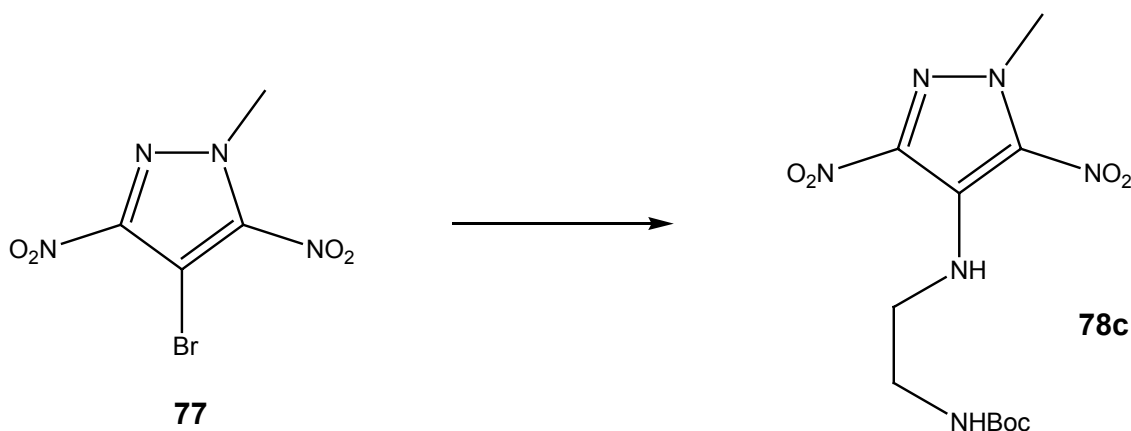
¹³C-NMR (250 MHz, CDCl₃-d₁): δ = 156.6 (-C=O), 79.2 (-C-(CH₃)₃), 45.1 (-C¹), 43.7 (-C²), 28.8 (-C-(CH₃)₃)

IR (NaCl, Film): ν = 3365 (s), 2976 (s), 2932 (s), 2869 (m), 1962 (w), 1817 (w), 1697 (s), 1520 (s), 1480 (s), 1454 (s), 1391 (m), 1365 (s), 1274 (m), 1250 (m), 1172 (s), 1037 (w), 953 (w), 873 (m), 780 (w), 680 (s)

Elementaranalyse (%) für C₇H₁₆N₂O₂ (160.21):

Berechnet: C 52.48 H 10.07 N 17.48

Gefunden: C 52.26 H 10.16 N 17.28

9.4.5 Synthese von [2-(1-Methyl-3,5-dinitro-4-ylaminopyrazol)-ethyl]-carbaminsäure-*tert*-butylester **78c**

In einem 100 ml Rundkolben wurden 4.00 g (16 mmol) **77** und 7.69 g (48 mmol) (2-Amino-ethyl)-carbaminsäure-*tert*-butylester **118** in 70 ml DMSO gelöst und für 4 h auf 100 °C erwärmt. Nach dieser Zeit wurde die Lösung auf 200 ml Eiswasser gegossen. Der dabei entstandene gelbe Niederschlag wurde abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Umkristallisation aus EtOH ergab **78c** als gelbe Kristalle.

Ausbeute: 4.38 g (83%)**R_f-Wert:** 0.7 (EtOAc/Hex 1:8)**Smp.:** 119-121 °C

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ = 7.10-7.05 (t, 1H, J = 3.7 Hz, Pyrazol-NH), 6.94-6.89 (t, 1H, J = 4.0 Hz, -Carbamat-NH), 4.19 (s, 3H, -N- CH_3), 3.49-3.42 (m, 2H, -1-Methylen- CH_2), 3.10-3.04 (m, 2H, -2-Methylen- CH_2), 1.33 (s, 9H, -t-Bu)

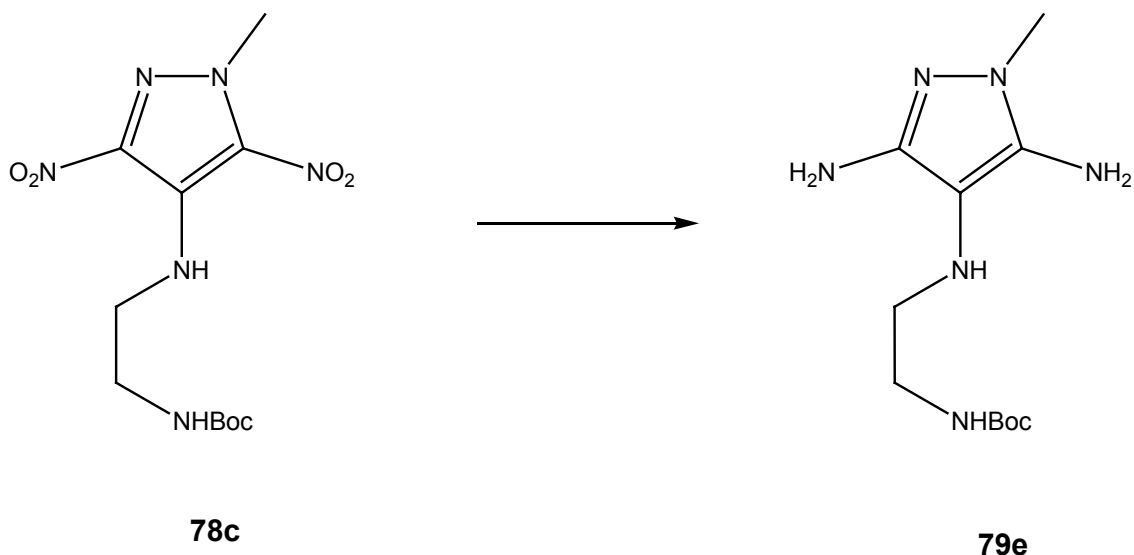
IR (KBr): ν = 3334 (s), 3086 (w), 1715 (s), 1684 (s), 1616 (s), 1576 (s), 1541 (m), 1506 (s), 1451 (m), 1397 (m), 1340 (s), 1306 (m), 1259 (m), 1231 (m), 1142 (m), 1075 (w), 1007 (w), 967 (w), 910 (w), 893 (w), 857 (w), 764 (m), 722 (w), 672 (m), 641 (w), 610 (w), 591 (m)

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_6$ (330.3):

Berechnet: C 40.00 H 5.49 N 25.44

Gefunden: C 40.04 H 5.52 N 25.25

9.4.6 Synthese von [2-(3,5-diamino-1-methyl-4-ylaminopyrazol)-ethyl]-carbaminsäure-*tert*-butylester **79e**



In einem einseitig verschlossenen, zuvor mit Argon gespülten, Quarzrohr wurden 6.61 g (20 mmol) **78c** in 45 ml MeOH suspendiert und mit 450 mg Pd/C

versetzt. Das Quarzrohr wurde in eine Druckapparatur eingeführt, die Apparatur dreimal mit Argon gespült und anschließend mit H₂-Gas (25 bar) beschickt. Man ließ für 12 h bei 80 °C rühren, belüftete anschließend und filtrierte die nunmehr klare, braune Lösung über Celite[®] ab und wusch gründlich mit MeOH nach. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, und der braune, ölige Rückstand säulenchromatographisch (EtOAc/MeOH 9:1) aufgereinigt. Man erhielt **79e** als braunes halbfestes Öl.

Ausbeute: 2.70 g (50%)

R_f-Wert: 0.1 (EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH 15:5:4:1), färbt mit Ninhydrin beim Erwärmen

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.70 (bs, 1H, -NH-Pyrazol), 6.81-6.78 (t, 1H, J = 5.2 Hz, -NH-Boc), 4.58 (s, 2H, -C⁵-NH₂), 4.05 (s, 2H, -C³-NH₂), 3.26 (s, 3H, -N-CH₃),

IR (KBr): ν = 3413 (s), 2976 (m), 2283 (w), 1696 (s), 1526 (m), 1452 (m), 1393 (m), 1366 (m), 1252 (m), 1166 (s), 1016 (m), 936 (w), 858 (w), 778 (w), 676 (w), 612 (m)

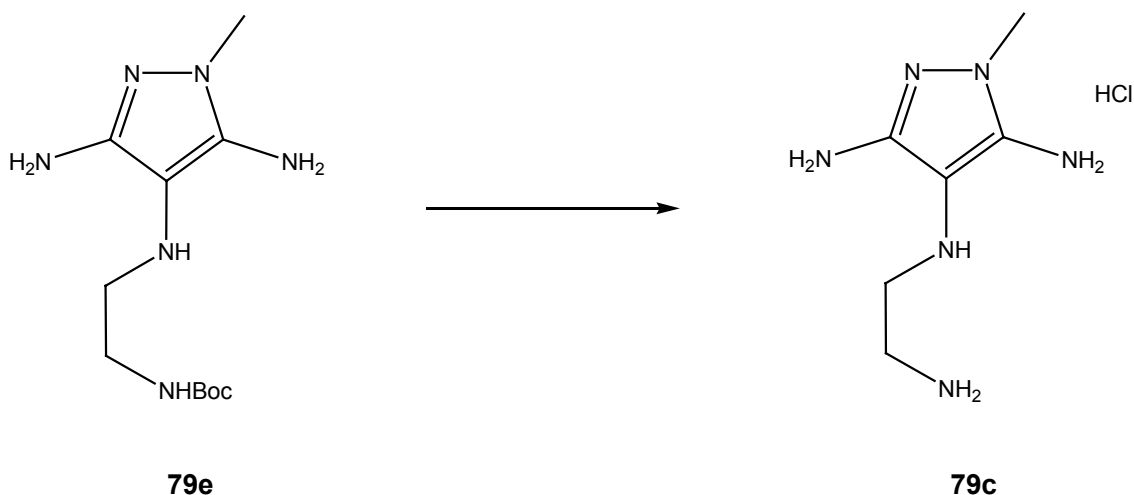
M (C₁₁H₂₂N₆O₂): berechnet: 270,33; MS (ESI⁺) m/z (%) = 271.0 (100 %, M+H⁺)

Elementaranalyse (%) für C₁₁H₂₂N₆O₂ x 0.5 MeOH x 0.15 H₂O (289.06):

Berechnet: C 47.78 H 8.47 N 29.07

Gefunden: C 47.48 H 8.65 N 29.29

9.4.7 Synthese von N⁴-(2-Aminoethyl)-1-methyl-1H-pyrazole-3,4,5-triamin als Hydrochlorid **79c**



In einem Schlenkkolben wurden 4.80 g (17.75 mmol) **79e** in 30 ml MeOH gelöst. Unter Rühren gab man bei 0 °C tropfenweise 21.12 g (12.9 ml, 177.5 mmol) Thionylchlorid hinzu. Man ließ für 2 h bei 0 °Citerrühren saugte den entstandenen braunen Feststoff ab und wusch zweimal mit je 10 ml MeOH nach. Anschließend wurde im Vakuum getrocknet und aus Wasser/MeOH umkristallisiert. Man erhielt das Hydrochlorid von **79c** als braunes Pulver.

Ausbeute: 2.31 g (63%)

R_f-Wert: 0.3 (EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH 20:2:2:1), färbt mit Ninhydrin beim Erwärmen

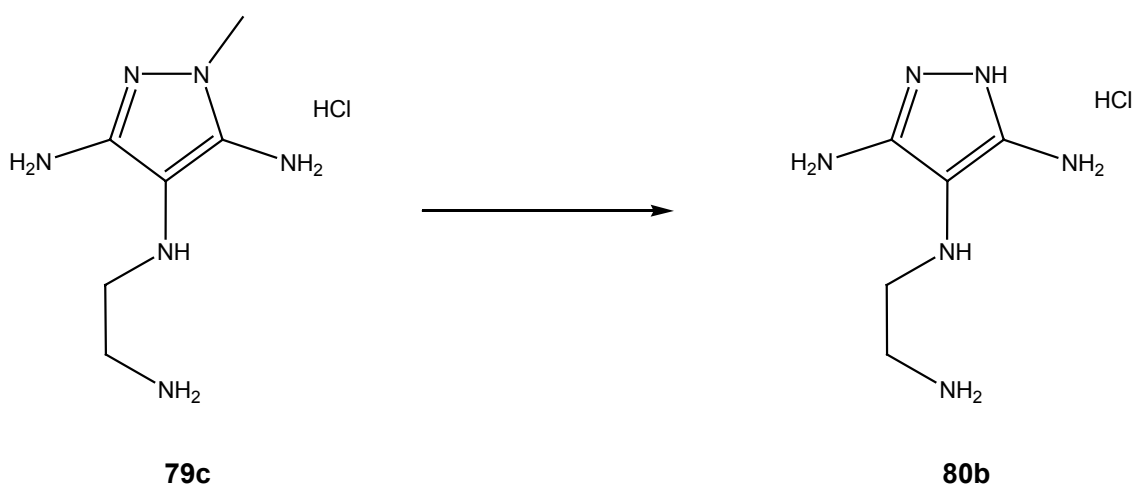
Smp.: 117-119 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.52-7.58 (bs, 8H, -NH, -NH₂, -NH₃⁺, teilweise von H₂O-Signal überdeckt), 3.48-3.42 (m, 2H, -NH-CH₂-), 3.16 (s, 3H, -N-CH₃), 3.15-3.10 (m, 2H, -CH₂-NH₃⁺)

IR (KBr): ν = 3384 (s), 3172 (s), 2346 (w), 1648 (s), 1498 (m), 802 (w), 617 (w), 550 (w)

M ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_6$): berechnet: 170.22; MS (ESI^+) m/z (%) = 170.9 (100 %, $\text{M}+\text{H}^+$)

9.4.8 Synthese von N^4 -(2-aminoethyl)-1H-pyrazole-3,4,5-triamin als Hydrochlorid **80b**



In einem 50 ml Rundkolben mit aufgesetztem Rückflusskühler wurden 1.32 g (6.4 mmol) **79c** zusammen mit 7.39 g (64 mmol) Pyridiniumhydrochlorid für 14 h unter einer Argonatmosphäre in einem Ölbad auf 210 °C erhitzt. Darauf wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und der schwarze Feststoff in 15 ml Acetonitril aufgenommen und für 30 min unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde über Nacht bei 4 °C stengelassen. Der ausgefallene braune Feststoff wurde abgesaugt und an 10 g Kieselgel adsorbiert. Säulenchromatographie ($\text{EtOAc/EtOH/H}_2\text{O/AcOH}$ 15:5:4:1) an 60 g Kieselgel ergab **80b** als braunen Feststoff.

Ausbeute: 247 mg (20%)

R_f-Wert: 0.35 ($\text{EtOAc/EtOH/H}_2\text{O/AcOH}$ 15:4:4:1), färbt mit Ninhydrin beim Erwärmen

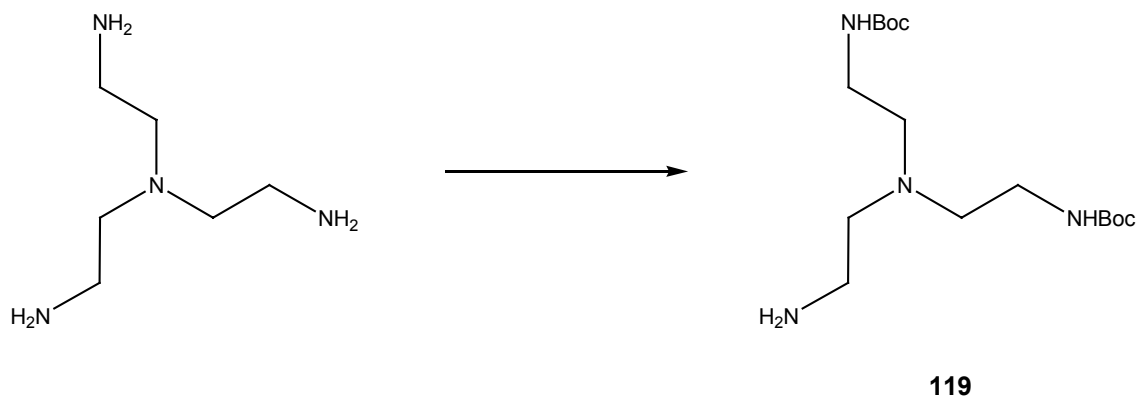
Smp.: 287-289 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 9.98 (bs, 1H, -C⁴-NH-Pyrazol), 8.47 (bs, 4H, Pyrazol-C^{3,5}-NH₂), 8.11 (bs, 3H, -NH₃⁺), 7.48 (bs, 1H, -NH-Pyrazol), 3.63-2.91 (m, 4H, -CH₂)

IR (KBr): ν = 3386 (s), 3112 (s), 1638 (s), 1570 (m), 1458 (w), 1307 (w), 1015 (w), 801 (w)

M (C₅H₁₂N₆): berechnet: 156.19; MS (ESI⁺) m/z (%) = 156.9 (100 %, M+H⁺)

9.4.9 Synthese von Bis-(2-Boc-aminoethyl)-(2-aminoethyl)-amin 119



5.86 g (6 ml, 40.08 mmol) des Trisamins wurden in 80 ml abs. THF vorgelegt und auf 0 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung gab man 20.73 g (84.18 mmol) Boc-ON, gelöst in 160 ml abs. THF, innerhalb von 70 min tropfenweise hinzu. Anschließend wurde für 2 h bei 0 °C und, nach dem langsamen Erwärmen auf Raumtemperatur, über Nacht weitergerührt. Das Lösungsmittel wurde daraufhin im Vakuum entfernt, das so erhaltene gelbe Öl in Essigester aufgenommen und zweimal mit jeweils 200 ml 0.5 N NaOH gewaschen. Die wässrige Phase wurde anschließend mit NaCl gesättigt und viermal mit jeweils 100 ml Essigester extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über MgSO₄ getrocknet. Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum und säulen-

chromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH/NH₃, 44:5:1) ergaben **119** als leicht gelbes Öl.

Ausbeute: 11.12 g (80 %)

R_f-Wert: 0.4 (DCM/MeOH/NH₃ 44:5:1) färbt mit Ninhydrin beim Erwärmen

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 7.40 (bs, 2H, -NH), 5.05 (bs, 2H, -NH₂), 3.57-3.55 (m, 2H, -CH₂-NH₂), 3.21-3.19 (m, 4H, -CH₂-NH-C(=O)-), 2.66-2.61 (t, 2H, J = 5.5 Hz, -CH₂-CH₂-NH₂), 2.55-2.53 (t, 4H J = 6.8 Hz, CH₂-CH₂-NH-C(=O)-), 1.39 (s, 18H, tBu-CH₃)

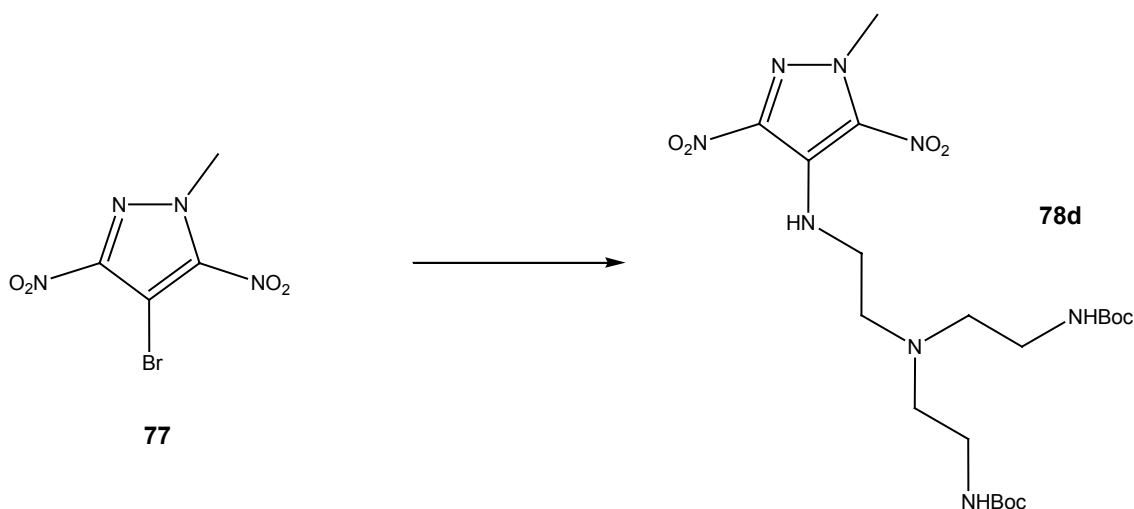
IR (NaCl, Film): ν = 3352 (m), 2977 (m), 2934 (m), 2819 (w), 1696 (s), 1527 (s), 1457 (m), 1392 (m), 1366 (s), 1276 (s), 1252 (s), 1174 (s), 1068 (w), 996 (w), 970 (w), 864 (w), 781 (w)

Elementaranalyse (%) für C₁₆H₃₄N₄O₄ x 0.8 eq H₂O (360.88):

Berechnet: C 53.25 H 9.94 N 15.52

Gefunden: C 53.50 H 10.24 N 15.73

9.4.10 Synthese von (2-{{2-*tert*-Butoxycarbonylamino-ethyl}-[2-(1-methyl-3,5-dinitro-4-ylaminopyrazol)-ethyl]-amino}-ethyl)-carbaminsäure-*tert*-butylester **78d**



4.02 g (16 mmol) 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitropyrazol **77** und 8.31 g (24 mmol) des Bisbocamins **119** wurden in 60 ml gelöst und 6 h bei 80 °C gerührt. Anschließend gab man die Reaktionslösung auf 300 ml Eiswasser. Die wässrige Phase wurde dreimal mit jeweils 100 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen trocknete man über MgSO_4 , entfernte das Lösungsmittel im Vakuum und reinigte säulenchromatographisch (EtOAc/MeOH, 9:1) auf. Man erhielt ein gelbes Öl von **78d**.

Ausbeute: 3.82 g (46%)

R_f-Wert: 0.35 (EtOAc/Hex 1:1)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.23-7.19 (t, 1H, J = 4.7 Hz, -NH-Pyrazol), 6.97 (bs, 2H, -NH-C(=O)-), 4.20 (s, 3H, -N-CH₃), 3.40-3.38 (m, 2H, -CH₂-NH-Pyrazol), 2.98-2.95 (m, 4H, -CH₂-NH-C(=O)-), 2.52-2.51 (t, 2H, J = 5.7 Hz, -CH₂-CH₂-NH₂), 2.47 (m, 4H J = 6.8 Hz, CH₂-CH₂-NH-C(=O)-, teilweise verdeckt von DMSO), 1.37 (s, 18H, tBu-CH₃)

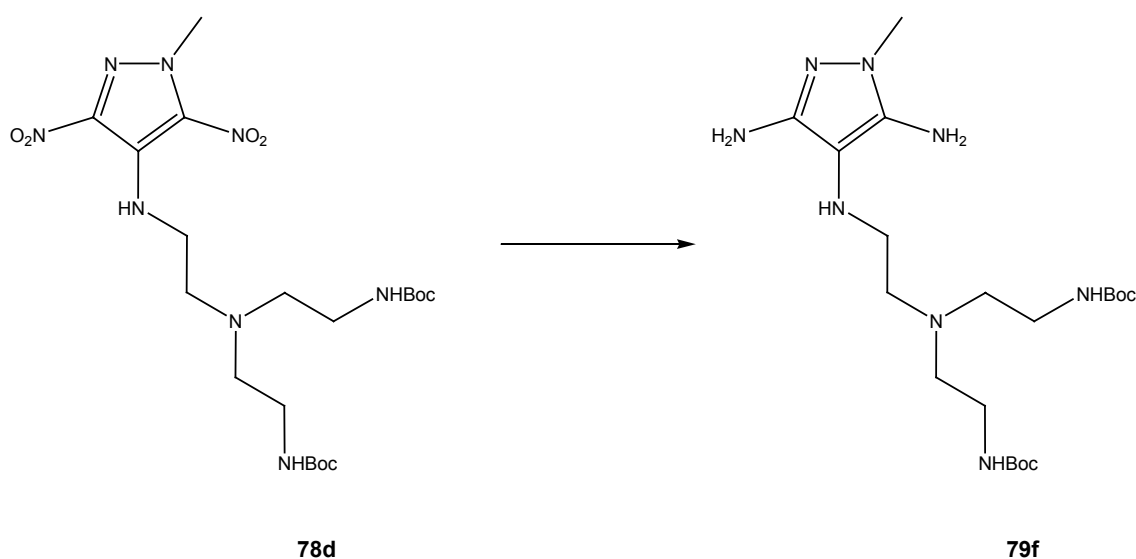
IR (NaCl, Film): ν = 3383 (m), 2982 (w), 1689 (s), 1625 (w), 1524 (m), 1479 (w), 1436 (m), 1365 (w), 1298 (m), 1171 (m), 1061 (w), 964 (w), 876 (w), 769 (w), 746 (w), 671 (w)

Elementaranalyse (%) für $C_{20}H_{36}N_8O_8$ (516.55):

Berechnet: C 46.50 H 7.02 N 21.96

Gefunden: C 46.30 H 7.09 N 21.83

9.4.11 Synthese von (2-{{2-*tert*-Butoxycarbonylamino-ethyl}-[2-(3,5-diamino-1methyl-4-ylaminopyrazol)-ethyl]-amino}-ethyl)-carbaminsäure-*tert*-butylester **79f**



1.37 g (2.65 mmol) des Bisbocderivates **78d** wurden in einem, zuvor mit Argon gespülten, einseitig geschlossenen Quarzrohr in 25 ml MeOH gelöst. Dazu gab man vorsichtig im Argongegenstrom 137 mg (10 ω-%) Pd/C. Das Quarzrohr wurde in eine Druckapparatur gegeben und verschlossen. Nach dreimaligem Spülen mit Argon stellte man einen H₂-Druck von 40 bar ein und ließ für 18 h bei 60 °C rühren. Anschließend filtrierte man über Celite[®] ab und wusch dreimal

mit jeweils 50 ml MeOH nach. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der braune Rückstand an 15 g Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch (EtOAc/MeOH, 8:2) aufgereinigt. Man erhielt so **79f** in Form eines braunen Pulvers.

Ausbeute: 956 mg (79%)

R_f-Wert: 0.3 (EtOAc/MeOH, 8:2)

Smp.: 146-147 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.70 (bs, 1H, Pyrazol-NH), 6.70 (bs, 2H, -NH-C(=O)-), 4.49 (bs, 2H, -C⁵-NH₂), 3.95 (bs, 2H, -C³-NH₂), 3.30-3.26 (m, 5H, -CH₂-NH-Pyrazol und -N-CH₃), 2.97-2.95 (m, 4H, -CH₂-NH-C(=O)-), 2.51-2.45 (m, 6H, -CH₂-CH₂-NH-Pyrazol und CH₂-CH₂-NH-C(=O)-, teilweise verdeckt von DMSO), 1.38 (s, 18H, tBu-CH₃)

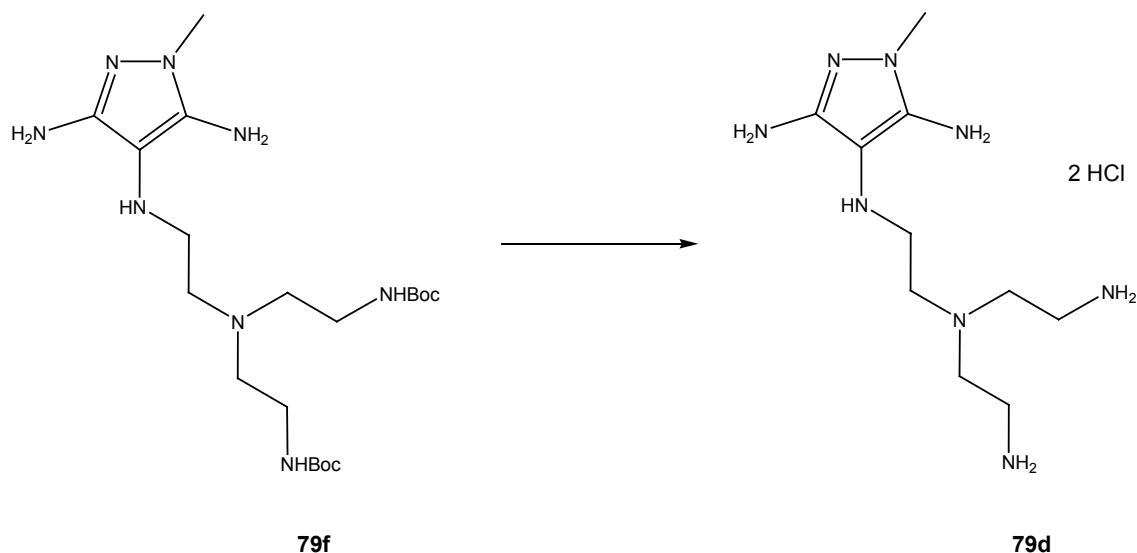
IR (KBr): ν = 3360 (m), 2976 (m), 2364 (w), 1701 (s), 1637 (w), 1522 (m), 1458 (w), 1391 (w), 1365 (m), 1251 (m), 1172 (s), 861 (w), 800 (m), 771 (w), 668 (w)

Elementaranalyse (%) für C₂₀H₄₀N₈O₄ (456.58):

Berechnet: C 52.61 H 8.83 N 24.54

Gefunden: C 52.78 H 8.59 N 24.31

9.4.12 Synthese von N⁴-{2-[Bis-(2-amino-ethyl)-amino]-ethyl}-1-methyl-3,4,5-triaminopyrazol **79d**



In einem Schlenkkolben wurden 460 mg (1.01 mmol) **79f** in 2 ml MeOH gelöst. Unter Rühren gab man bei 0 °C tropfenweise 1.19 g (726 µl, 10 mmol) Thionylchlorid hinzu. Man ließ für 30 min bei 0 °Citerrühren, saugte den entstandenen leicht braunen Feststoff ab und wusch zweimal mit je 3 ml MeOH nach. Anschließend wurde im Vakuum getrocknet und aus Wasser/MeOH umkristallisiert. Man erhielt das Hydrochlorid von **79d** als braunes Pulver.

Ausbeute: 273 mg (83%)

R_f-Wert: 0.1 (EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH 15:5:4:1), färbt mit Ninhydrin beim Erwärmen

Smp.: 165-166 °C

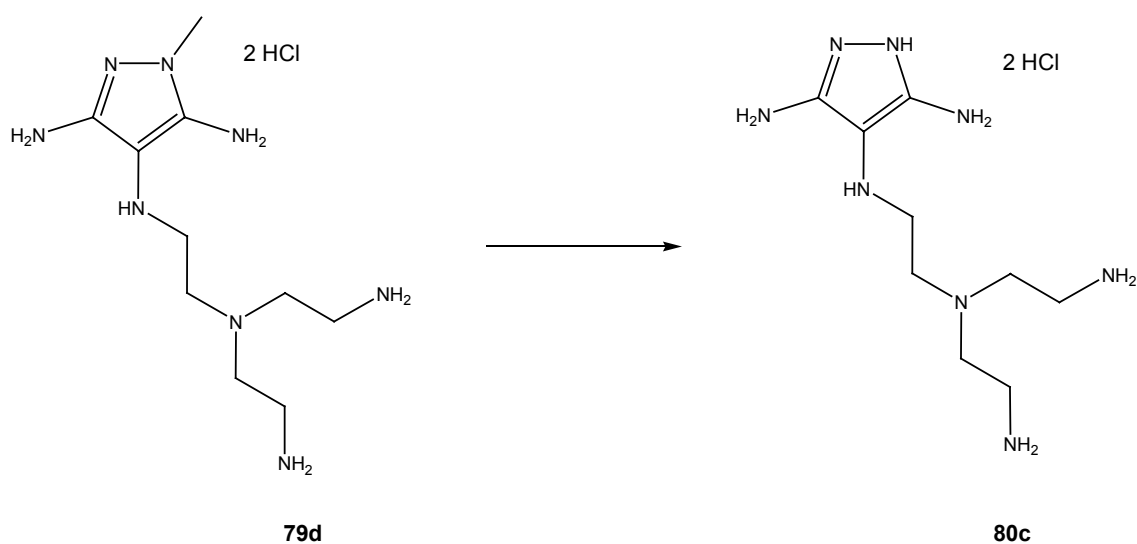
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.24 (bs, 1H, -NH-Pyrazol, austauschbar mit D₂O) 8.55 (bs, 4H, Pyrazol-C^{3,5}-NH₂, austauschbar mit D₂O), 8.32 (bs, 6H, -NH₃⁺, austauschbar mit D₂O), 3.44-2.78 (m, 15H, -CH₂ und -N-CH₃)

IR (KBr): ν = 3382 (s), 3004 (s), 2285 (w), 1638 (s), 1477 (m), 1090 (m), 1016 (w), 783 (w), 672 (w)

Elementaranalyse (%) für C₁₀H₂₆Cl₂N₈ (329.27):

Berechnet: C 36.48 H 7.96 N 21.53

Gefunden: C 36.12 H 8.17 N 21.25

9.4.13 Synthese von N⁴-{2-[Bis-(2-amino-ethyl)-amino]-ethyl}-1*H*-3,4,5-triaminopyrazol **80c**

In einem 10 ml Rundkolben mit aufgesetztem Rückflusskühler wurden 345 mg (1.05 mmol) **79d** zusammen mit 1.21 g (10.5 mmol) Pyridiniumhydrochlorid für 8 h unter einer Argonatmosphäre in einem Ölbad auf 180 °C erhitzt. Daraufhin wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, der schwarze Feststoff in 3 ml Acetonitril aufgenommen und für 30 min unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde über Nacht bei 4 °C stengelassen. Der ausgefallene braune Feststoff wurde abgesaugt und an 2 g Kieselgel adsorbiert. Säulenchromatographie (EtOAc/MeOH, 1:2) an 20 g Kieselgel ergaben **80c** als braunen Feststoff.

Ausbeute: 153 mg (43%)

R_f-Wert: 0.05 (EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH 15:5:4:1), färbt mit Ninhydrin beim Erwärmen

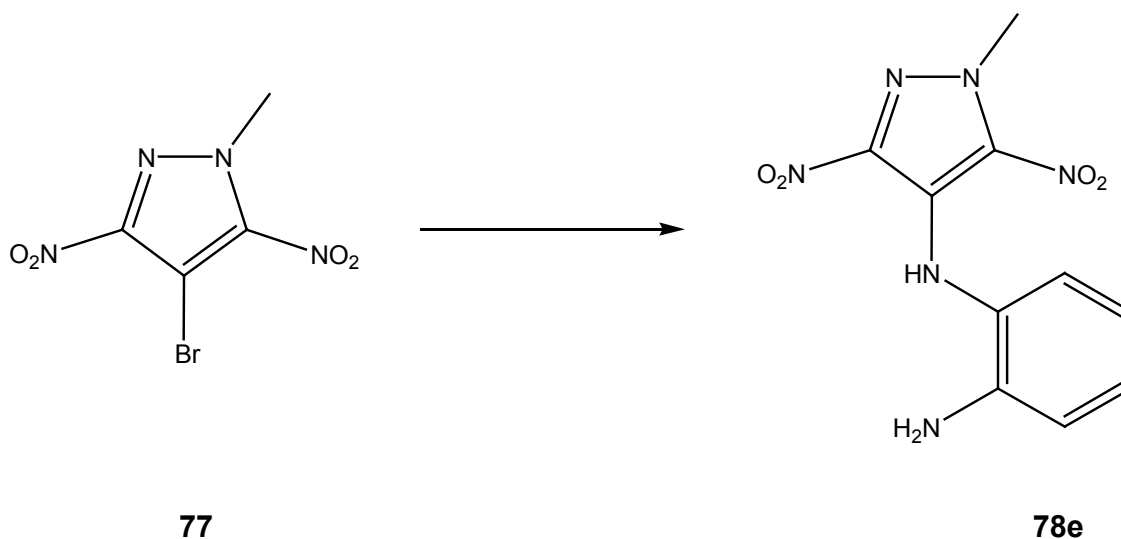
Smp.: 256-259 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.33 (bs, 1H, -C⁴-NH-Pyrazol), 8.63 (bs, 4H, Pyrazol-C^{3,5}-NH₂), 8.40 (bs, 6H, -NH₃⁺), 7.25 (bs, 1H, -NH-Pyrazol), 3.72-2.84 (m, 12H, -CH₂)

IR (KBr): ν = 3352 (w), 2977 (m), 2934 (m), 2819 (m), 1696 (s), 1527 (s), 1457 (m), 1392 (m), 1366 (m), 1276 (m), 1252 (m), 1174 (s), 1068 (w), 996 (w), 970 (w), 864 (w), 781 (w)

M (C₉H₂₂N₈): berechnet: 242.32; MS (MALDI⁺) m/z (%) = 242.68 [100%, M⁺ + H⁺]

9.4.14 Synthese von *N*-(1-Methyl-3,5-dinitro-4-yl)-benzen-1,2-diamin **78e**



Eine Lösung von 3.01 g (12 mmol) 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitropyrazol **77** und 3.89 g (36 mmol) Phenyldiamin in 80 ml DMSO wurde unter Rühren für 24 h

auf 80 °C erwärmt. Anschließend gab man die Reaktionslösung auf 200 ml Eiswasser, extrahierte dreimal mit jeweils 50 ml EtOAc und trocknete die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄. Nach dem Abfiltrieren vom Trockenmittel wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung zu einem braunroten Feststoff erfolgte über Säulenchromatographie (EtOAc/Hex, 3:1) an 120 g Kieselgel. Um eine analytische Probe zu erhalten wurde aus MeOH umkristallisiert. Man erhielt so nadelförmige, rote Kristalle.

Ausbeute: 2.37 g (71%)

R_f-Wert: 0.35 (EtOAc/Hex 5:1)

Smp.: 144-147 °C

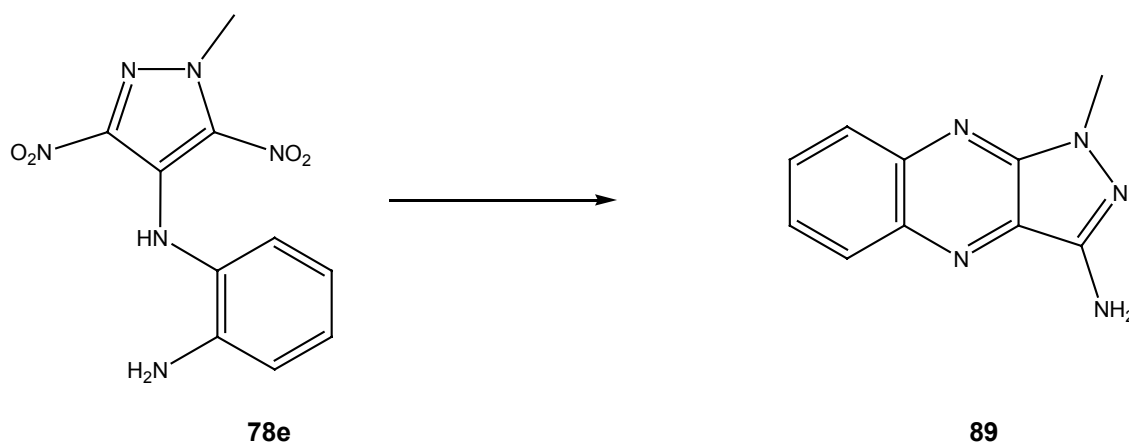
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.30 (bs, 1H, -NH-Pyrazol), 6.90-6.83 (m, 2H, -H^{4,5}), 6.73-6.70 (d, 1H, J = 6.7 Hz, -H⁶), 6.52-6.49 (t, 1H, J = 7.1 Hz, -H³), 4.92 (bs, 2H, -NH₂), 4.24 (s, 3H, -N-CH₃)

IR (KBr): ν = 3443 (m), 3360 (m), 3310 (m), 1599 (s), 1536 (m), 1483 (s), 1429 (s), 1383 (s), 1364 (s), 1313 (s), 1058 (m), 934 (w), 880 (w), 828 (m), 797 (s), 746 (s), 697 (s), 604 (w), 578 (w)

Elementaranalyse (%) für C₁₀H₁₀N₆O₄ (278.22):

Berechnet: C 43.17 H 3.62 N 30.21

Gefunden: C 43.18 H 3.54 N 30.00

9.4.15 Synthese von 1-Methyl-1H-pyrazolo-[4,3-b]-quinoxalin-3-amin **89**

2.78 g (10 mmol) **78e** wurden in einem einseitig geschlossenen Quarzrohr, welches zuvor mit Argon gespült wurde, in 40 ml EtOH gelöst. Dazu gab man vorsichtig im Argongegenstrom 278 mg (10 ω-%) Pd/C. Das Quarzrohr wurde in eine Druckapparatur gegeben, dreimal mit Argon gespült und verschlossen. Man stellte einen H₂-Druck von 25 bar ein und ließ für 3 d bei 80 °C rühren. Anschließend filtrierte man über Celite[®] ab und wusch dreimal mit jeweils 80 ml EtOH nach. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der tiefrote Rückstand an 25 g Kieselgel adsorbiert und säulenchromatographisch (EtOAc/Hex, 1:1) aufgereinigt. Das so gewonnene rote Pulver wurde zweimal aus EtOAc umkristallisiert. Man erhielt nadelförmige Kristalle von **89**.

Ausbeute: 1.09 g (56%)

R_f-Wert: 0.5 (EtOAc/Hex, 1:1)

Smp.: 200-201 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.94-7.90 (m, 2H, -Aryl-CH), 7.47-7.44 (m, 2H, -Aryl-CH), 3.36 (bs, 2H, -NH₂), 3.29 (s, 3H, -N-CH₃)

IR (KBr): ν = 3375 (m), 3320 (m), 3187 (m), 1643 (s), 1622 (m), 1578 (s), 1561 (s), 1489 (s), 1398 (s), 1353 (w), 1324 (w), 1246 (w), 1192 (s), 1111 (s), 835 (w), 757 (s), 744 (s), 686 (w), 640 (w), 620 (w), 598 (w)

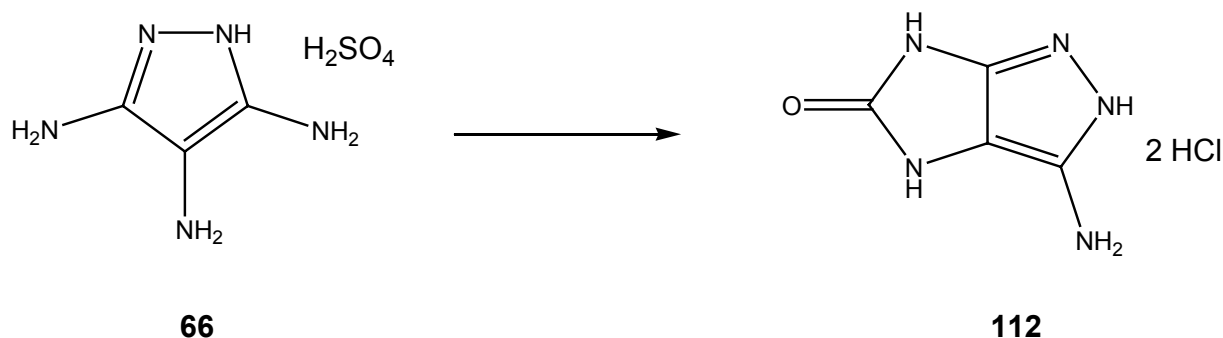
M (C₁₀H₉N₅): berechnet: 199.21; MS (ESI⁺) m/z (%) = 199.8 (100 %, M+H⁺)

Elementaranalyse (%) für C₁₀H₉N₅ x 0.1 H₂O (201.01):

Berechnet: C 59.75 H 4.61 N 34.84

Gefunden: C 59.53 H 4.58 N 34.87

9.4.16 Synthese von 3-Aminoimidazo-[4,5-c]pyrazol-5(2H,4H,6H)-on **112**



Zu einer Lösung von 229 mg (1 mmol) **66** und einer katalytischen Menge DMAP in 10 ml dest. Wasser wurden bei 0 °C tropfenweise 109 mg (580 µl einer 20 %-igen Lösung in Toluol, 1.1 mmol) Phosgen gegeben. Man ließ die entstandene Emulsion 2 h bei Raumtemperaturiterrühren, entfernte dann das Lösungsmittel im Vakuum und kristallisierte den braunen Feststoff aus salzsaurem Wasser um. Man erhielt einen braunen, mikrokristallinen Feststoff.

Ausbeute: 130 mg (61%)

R_f-Wert: 0.25 (EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH 15:5:4:1), färbt mit Ninhydrin beim Erwärmen

Smp.: 288-289 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.94 (bs, 2H, Pyrazol-NH), 7.36 (bs, 3H, -NH₃⁺), 5.51 (bs, 2H, -NH),

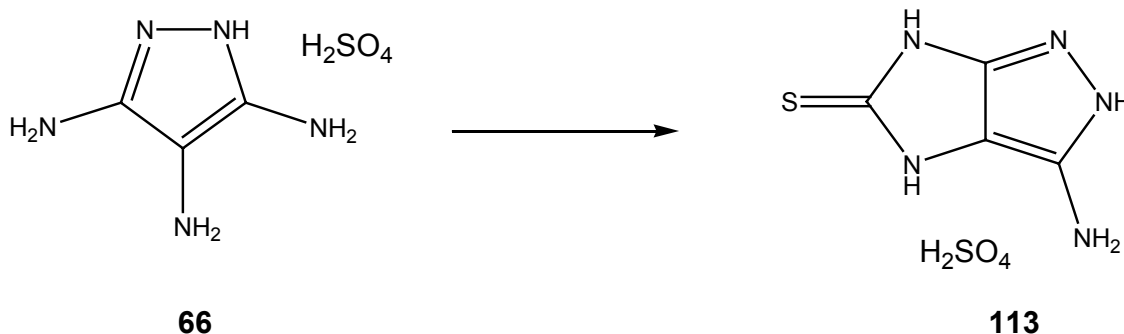
IR (KBr): ν = 3331 (s), 3134 (s), 2926 (s), 1677 (s), 1638 (s), 1558 (s), 1489 (m), 1385 (w), 1269 (m), 1055 (s), 971 (s), 787 (m), 676 (m), 608 (s)

Elementaranalyse (%) für C₄H₇Cl₂N₅O x 1 H₂O (230.05):

Berechnet: C 20.88 H 3.94 N 30.44

Gefunden: C 20.66 H 4.20 N 30.26

9.4.17 Synthese von 3-Aminoimidazo-[4,5-c]-pyrazol-5(2H,4H,6H)-thion 113



Zu einer Lösung von 229 mg (1 mmol) **66** und katalytischen Mengen DMAP in 10 ml Wasser wurden bei 0 °C tropfenweise 126 mg (93 µl einer 90 %-igen Lösung, 1.1 mmol) Thiophosgen zugegeben. Die Lösung färbte sich hierbei von gelb nach orange. Nach 5 min begann ein orangefarbener Feststoff aus der Lösung auszufallen. Es wurde für weitere 3 h bei 0 °C gerührt, daraufhin der

Feststoff abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Umkristallisation aus schwefelsaurem MeOH ergab einen leicht orangenen Feststoff von **113**.

Ausbeute: 132 mg (52%)

R_f-Wert: 0.3 (EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH 15:5:4:1), färbt mit Ninhydrin beim Erwärmen

Smp.: > 300 °C

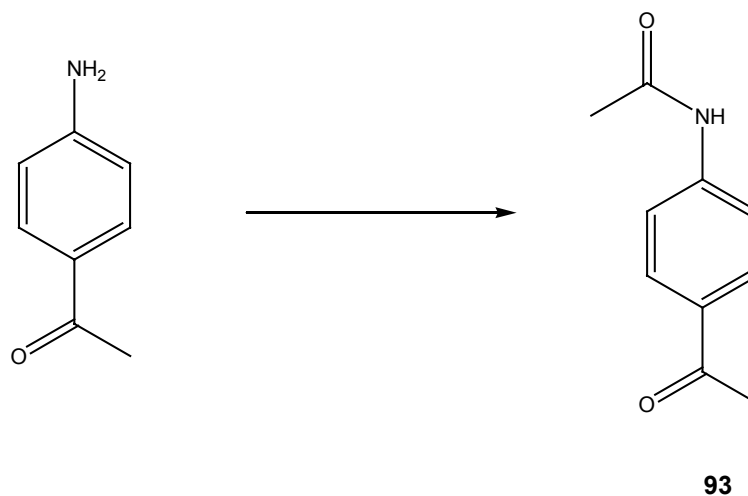
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 11.62 (bs, 2H, Pyrazol-NH), 11.09 (bs, 2H, -NH), 8.40 (bs, 3H, -NH₃⁺)

IR (KBr): ν = 3449 (m), 3251 (m), 3204 (m), 3152 (w), 3006 (w), 1819 (w), 1639 (s), 1512 (m), 1468 (s), 1414 (w), 1386 (w), 1307 (s), 1260 (m), 1140 (w), 1017 (m), 924 (m), 830 (m), 759 (w), 722 (w), 671 (w), 645 (w)

Elementaranalyse (%) für C₄H₇N₅O₄S₂ (253.26):

Berechnet: C 18.97 H 2.79 N 27.65

Gefunden: C 18.29 H 2.87 N 27.63

9.4.18 Synthese von 4-Acetamidoacetophenon 93

Zu einer Lösung von 20.00 g (148 mmol) 4-Aminoacetophenon in 100 ml 1,4-Dioxan/H₂O (50:50) wurden über einen Zeitraum von 30 min bei 0 °C tropfenweise 15.11 g (13.98 ml, 148 mmol) Essigsäureanhydrid zugegeben. Dabei bildete sich sofort eine weiße Suspension. Nach 2 h unter kräftigem Rühren wurde die Suspension auf etwa die Hälfte des Volumens eingeeengt und der weiße Niederschlag abgesaugt. Umkristallisation aus EtOAc ergab farblose Kristalle von **93**.

Ausbeute: 25.92 g (99%)

R_f-Wert: 0.6 (Hex/EE 8:1)

Smp.: 169-170 °C (Lit.: 170-172 °C)¹³⁶

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.28 (bs, 1H, -NH), 7.93-7.90 (d, J = 8.7 Hz, 2H, -H^{2,6}-Aromat), 7.74-7.70 (d, J = 8.7 Hz, 2H, -H^{3,5}-Aromat), 2.52 (s, 3H, -CH₃-Acetyl), 2.10 (s, 3H, -CH₃-NH-Acetyl)

¹³C-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 196.7 (-C=O Acetyl), 168.9 (-C=O, NH-Acetyl), 143.6 (-C⁴-Aromat), 131.4 (-C¹-Aromat), 129.4 (-C^{2,6}-Aromat), 118.1 (-C^{3,5}-Aromat), 26.3 (CH₃-Acetyl), 24.1 (-CH₃-NH-Acetyl)

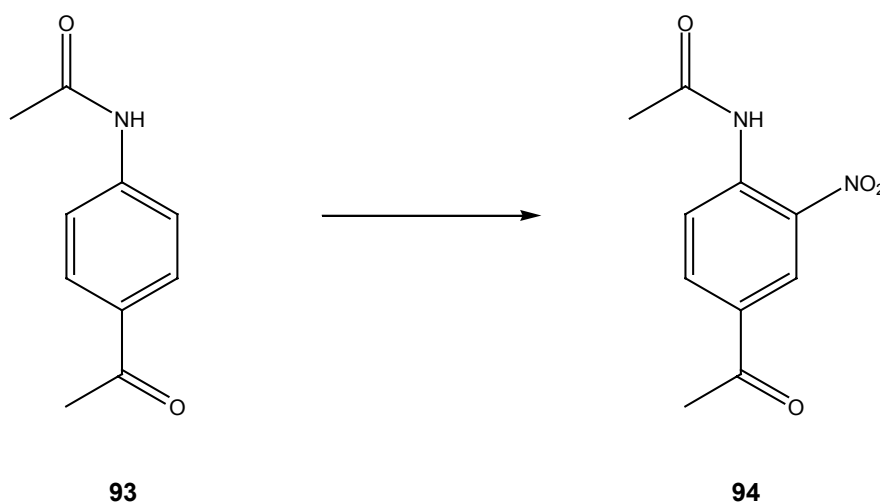
IR (KBr): ν = 3265 (s), 3187 (s), 3114 (m), 3050 (m), 1674 (s), 1590 (s), 1539 (s), 1409 (s), 1368 (s), 1317 (s), 1263 (s), 1181 (w), 1077 (w), 1040 (w), 1017 (m), 964 (m), 954 (m), 854 (s), 383 (s), 760 (m), 724 (w), 618 (m), 593 (m), 504 (m), 476 (m)

Elementaranalyse (%) für $C_{10}H_{11}NO_2$ (177.20):

Berechnet: C 67.78 H 6.26 N 7.90

Gefunden: C 67.87 H 6.14 N 7.90

9.4.19 Synthese von N-(4-Acetyl-2-nitrophenyl)-acetamid **94**



22.43 g (127 mmol) der acetylgeschützten Verbindung **93** wurden vorsichtig portionsweise in 60 ml 100 %-ige Salpetersäure, gekühlt durch eine Eis/Kochsalzmischung, gegeben. Hierbei durfte die Temperatur 5 °C nicht übersteigen. Die Lösung wurde nach erfolgter Zugabe in 800 ml Eiswasser gegeben. Dabei fiel ein gelber Feststoff aus, welcher abgesaugt und im

Vakuum getrocknet wurde. Umkristallisation aus EtOH ergaben nadelförmige gelbe Kristalle.

Ausbeute: 20.32 g (72%)

R_f-Wert: 0.6 (Hex/EE 8:1)

Smp.: 141-142 °C (Lit.: 140-141 °C)¹³⁷

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.55 (bs, 1H, -NH), 8.41 (s, 1H, *H*³-Aromat), 8.25-8.21 (d, J = 8.5 Hz, 1H, *H*⁵-Aromat), 7.85-7.82 (d, J = 8.5 Hz, 1H, *H*⁶-Aromat), 2.62 (s, 3H, -CH₃-Acetyl), 2.13 (s, 3H, -CH₃-NH-Acetyl)

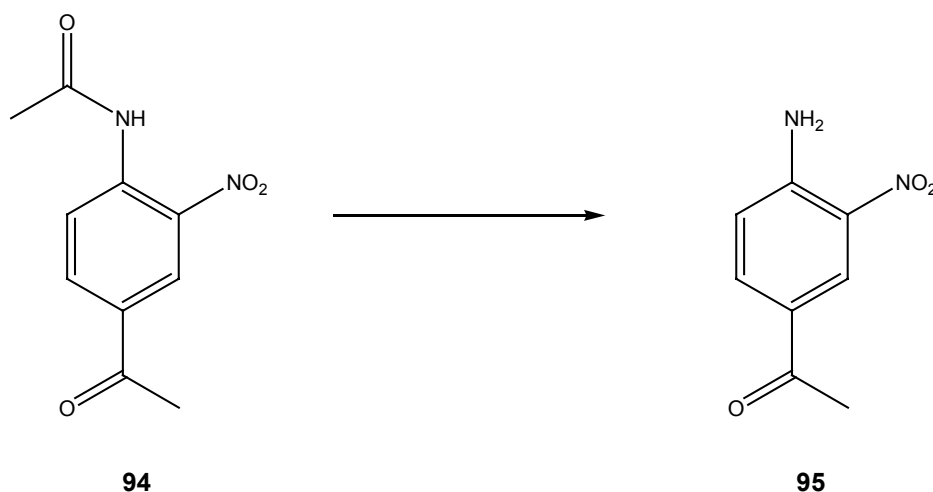
¹³C-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 195.6 (-C=O Acetyl), 168.7 (-C=O, NH-Acetyl), 141.3 (-C⁴-Aromat), 135.0 (-C³-NO₂), 133.2 (-C⁶-Aromat), 132.5 (-C¹-Aromat), 125.0 (-C²-Aromat), 124.4 (-C⁵-Aromat) 26.6 (-CH₃-Acetyl), 23.6 (-CH₃-NH-Acetyl)

IR (KBr): ν = 3348 (s), 3088 (m), 1721 (s), 1685 (s), 1614 (s), 1574 (s), 1512 (s), 1452 (s), 1397 (s), 1384 (m), 1343 (m), 1306 (m), 1262 (m), 1143 (m), 1075 (w), 1008 (w), 967 (w), 908 (w), 894 (w), 853 (s), 764 (m), 676 (m), 642 (w), 590 (s), 510 (w)

Elementaranalyse (%) für C₁₀H₁₀N₂O₄ x 1 H₂O (224.20):

Berechnet: C 53.62 H 4.59 N 12.51

Gefunden: C 53.32 H 4.47 N 12.41

9.4.20 Synthese von 4-Acetyl-2-nitroanilin **95**

18.00 g Acetanilid **94** (81 mmol) wurden unter Rückfluss in einer Lösung aus 71 ml konz. HCl und 24 ml Wasser für 30 min zum Sieden erhitzt. Daraufhin kühlte man auf Raumtemperatur ab, wobei sich ein brauner Niederschlag bildete. Zur Vervollständigung der Ausfällung wurde über Nacht bei 4 °C stehen gelassen. Anschließend wurde abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Man erhielt ein braune Pulver von **95**.

Ausbeute: 13.01 g (89%)

R_f-Wert: 0.55 (EE/Hex 1:1), färbt in der Wärme mit Ninhydrin

Smp.: 150-153 °C (Lit.: 153-154 °C)¹³⁸

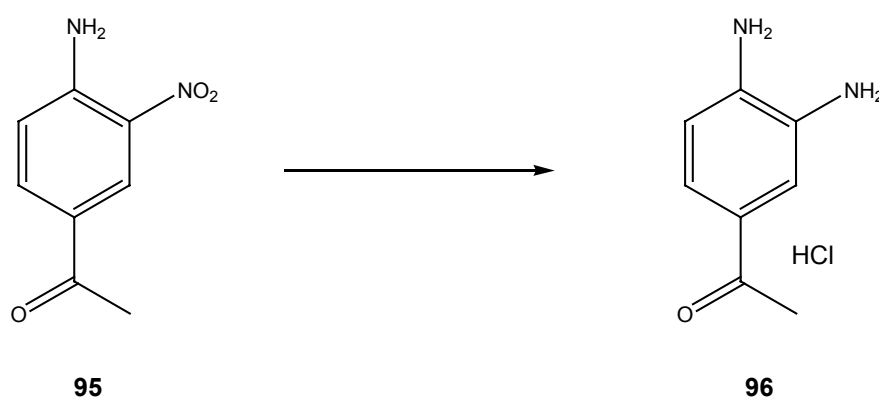
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 8.55 (s, 1H, -H²-Aromat), 7.99 (bs, 2H, -NH₂), 7.91-7.88 (d, 1H, J = 8.94 Hz, -H⁶-Aromat), 7.10-7.04 (d, 1H, J = 8.94 Hz, -H⁵-Aromat), 2.49 (s, 3H, CH₃-Acetyl)

IR (KBr): ν = 3448 (m), 3328 (s), 1670 (s), 1626 (s), 1557 (s), 1519 (s), 1478 (s), 1421 (m), 1360 (s), 1253 (s), 1158 (m), 1071 (m), 1023 (w), 954 (w), 909 (w), 833 (m), 766 (w), 745 (w), 666 (w), 593 (m)

Elementaranalyse (%) für C₈H₈N₂O₃ (180.16):

Berechnet: C 53.33 H 4.48 N 15.52

Gefunden: C 53.27 H 4.25 N 15.33

9.4.21 Synthese von 3,4-Diaminoacetophenon 96 als Hydrochlorid

In einem 250 ml Schlenkkolben löste man unter Argonatmosphäre 13.51 g (75 mmol) **95** in 150 ml EtOH. Zu dieser Lösung wurden im Argongegenstrom 678 mg Pd/C gegeben und ein mit H₂-Gas gefüllter Ballon auf den Kolben aufgesetzt. Man ließ 16 h bei 40 °C im Ölbad rühren, filtrierte über Celite[®] ab und wusch mit MeOH bis die Lösung farblos wurde nach. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der braune Rückstand in 50 ml MeOH aufgenommen und unter reduziertem Druck an 50 g Kieselgel adsorbiert. Säulenchromatographie (EtOAc/MeOH, 9:1) an 300 g Kieselgel lieferten ein braunes Öl. Dieses wurde in 100 ml EtOH aufgenommen und mit HCl-gesättigtem Diethylether (250 ml) wieder ausgefällt. Nach Absaugen und Umkristallisation aus wenig EtOH erhielt man das Hydrochlorid von **96**.

Ausbeute: 10.78 g (77 %)

R_f-Wert: 0.8 (EE/MeOH 9:1), färbt mit Ninhydrin

Smp.: 131-132 °C (Lit.: 132-133 °C)¹³⁹

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.85 (s, 1H, -H²-Aromat), 7.73-7.70 (d, 1H, J = 8.53 Hz, -H⁶-Aromat), 7.50 (bs, 6H, -NH₃⁺) 6.90-6.84 (d, 1H, J = 8.54 Hz, -H⁵-Aromat)

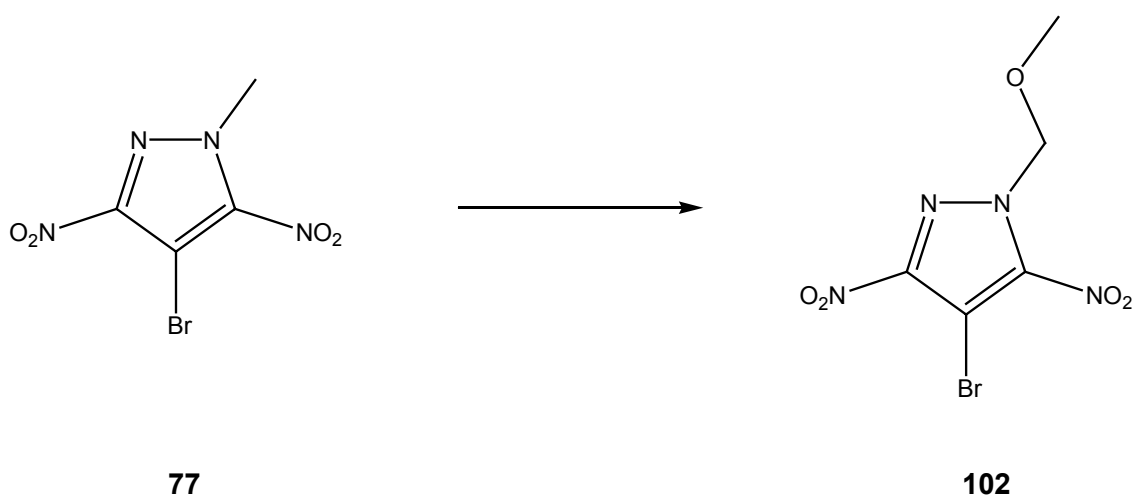
IR (KBr): ν = 3444 (m), 3361 (m), 3311 (m), 1624 (m), 1599 (s), 1506 (s), 1483 (s), 1431 (m), 1384 (m), 1362 (m), 1314 (s), 1059 (w), 934 (w), 881 (w), 828 (m), 798 (m), 754 (m), 747 (s), 698 (w), 578 (w)

Elementaranalyse (%) für C₈H₁₁ClN₂O x 0.15 H₂O (189.34):

Berechnet: C 50.75 H 6.02 N 14.80

Gefunden: C 50.55 H 5.95 N 15.13

9.4.22 Synthese von 4-Bromo-1-(methoxymethyl)-3,5-dinitro-1H-pyrazol 102



Zu einer Lösung aus 502 mg (2 mmol) **77** und 50 mg RuCl₃ · H₂O in 10 ml MeOH gab man bei 0 °C tropfenweise 680 mg (2.04 ml einer 30 %-igen

Lösung, 20 mmol) Wasserstoffperoxid über einen Zeitraum von 30 min hinzu. Nach dieser Zeit wurde die Lösung mit 2.8 g (50 mmol) KOH versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließendes Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und säulenchromatographische (EtOAc/Hex, 1:5) Aufreinigung ergaben einen weißen Feststoff, der zweimal aus wenig EtOH umkristallisiert wurde. Man erhielt **102** in Form weißer Kristalle.

Ausbeute: 444 mg (79%)

R_f-Wert: 0.6 (Hex/EE 2:1)

Smp.: 68-69 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 4.11 (s, 3H, -CH₃), 3.81 (s, 2H, -CH₂-)

¹³C-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 152.3 (-C₃), 148.8 (-C₅), 75.9 (-C-Br), 62.4 (-CH₃), 36.0 (-CH₂)

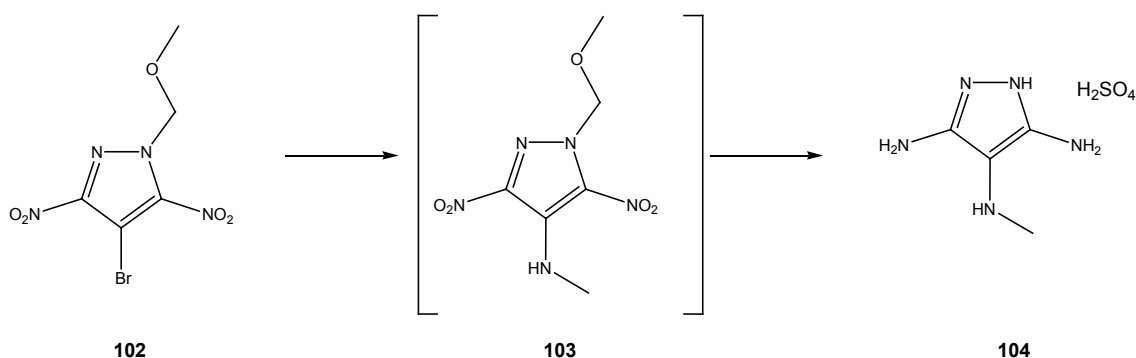
IR (KBr): ν = 2946 (m), 1949 (w), 1845 (w), 1568 (s), 1531 (s), 1485 (s), 1401 (s), 1379 (s), 1333 (s), 1289 (s), 1215 (m), 1170 (m), 1067 (w), 1038 (s), 980 (s), 869 (s), 776 (s), 758 (m), 722 (m), 672 (w), 624 (m)

Elementaranalyse (%) für C₅H₅N₄O₅ x 1 EtOH (327.09):

Berechnet: C 25.70 H 3.39 N 17.13

Gefunden: C 25.51 H 3.55 N 17.10

9.4.23 Synthese von 1H-3,5-diamino-4-aminomethylpyrazol 104



1.41 g (5 mmol) **102** wurden in 40 ml Methylamin (40% in Wasser) gelöst und für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung im Vakuum auf etwa 20 ml eingengt und über Nacht bei 4 °C stehen gelassen. Daraufhin wurden die ausgefallenen braun-gelben Kristalle abgesaugt und in 25 ml MeOH aufgenommen. Die Lösung wurde in ein einseitig verschlossenes Quarzrohr überführt und unter Argon mit 100 mg Pd/C versetzt. Das Quarzrohr wurde in eine Druckapparatur eingeführt und nach dreimaligem Spülen mit Argon mit Wasserstoffgas eine Druck von 30 bar aufgebaut. Nach 16 h Rühren bei diesem Druck wurde die Apparatur entlüftet und die Lösung über Celite[®] auf 2 ml halbkonzentrierte Schwefelsäure abfiltriert. Nach dreimaligem Spülen mit je 20 ml MeOH wurden zur Ausfällung 100 ml Diethylether zu der Lösung hinzugegeben. Der entstandene farblose Niederschlag wurde abgesaugt und aus wenig Wasser umkristallisiert. Man erhielt **104** in Form eines leicht gelben Pulvers als Monohydrat.

Ausbeute: 523 mg (43 %, über zwei Stufen)

R_f-Wert: 0.05 (EtOAc/EtOH/H₂O/AcOH 15:5:4:1), färbt mit Ninhydrin beim Erwärmen

Smp.: 256-258 °C (Zersetzung)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ = 11.19 (bs, 2H, Ring-NH und NH^+), 6.64 (bs, 5H, $-\text{NH}_2$ und $-\text{NH}_3^+$), 4.74 (s, 1H, $-\text{4-NH}$), 3.07 (s, 3H, $-\text{CH}_3$)

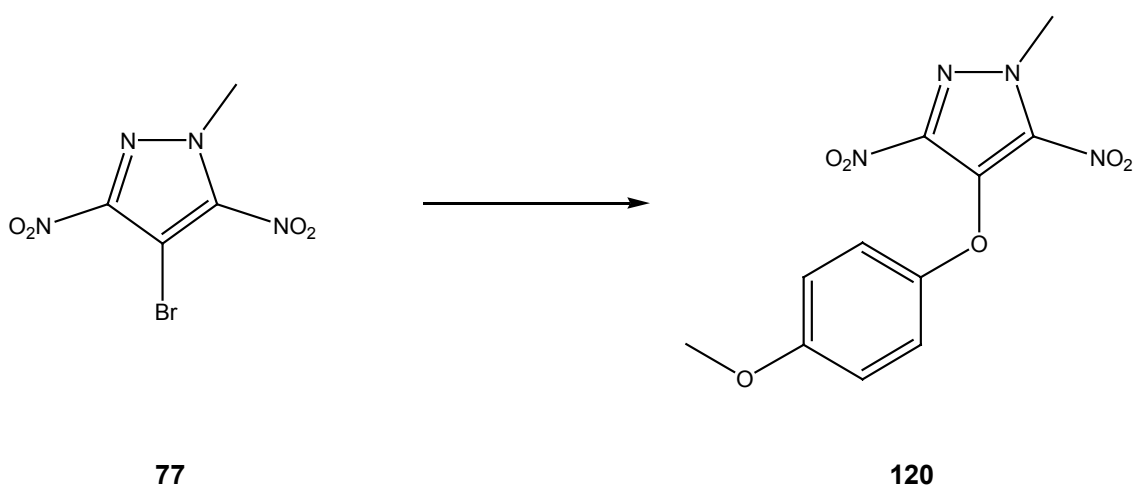
IR (KBr): ν = 3064 (s), 2844 (s), 2724 (s), 2489 (m), 1741 (w), 1557 (s), 1489 (s), 1391 (s), 1329 (s), 1267 (s), 1201 (s), 1036 (s), 985 (s), 898 (m), 793 (s), 754 (w), 716 (s), 662 (w), 605 (m)

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_4\text{S} \times 1 \text{ H}_2\text{O}$ (243.24):

Berechnet: C 19.75 H 5.39 N 28.79

Gefunden: C 19.87 H 5.44 N 28.55

9.4.24 Synthese von 4-(4-Methoxyphenoxy)-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol **120**



Zu einer Lösung von 3.10 g (25 mmol) 4-Methoxyphenol in 25 ml THF gab man 720 mg (1.20 g einer 60 %-igen Suspension in Mineralöl, 30 mmol) NaH in kleinen Portionen hinzu. Nach der Beendigung der Gasentwicklung tropfte man 2.04 g (8 mmol) 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitropyrazol **77**, gelöst in 20 ml THF über einen Zeitraum von 20 min hinzu. Daraufhin wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand an 10 g Kieselgel adsorbiert. Die

Aufreinigung erfolgte über eine Säulenchromatographie (EtOAc/Hex, 1:3). Man erhielt einen gelben Feststoff, der aus EtOH umkristallisiert **120** in Form nadelförmiger, gelber Kristalle lieferte.

Ausbeute: 1.95 g (83%)

R_f-Wert: 0.4 (EtOAc/Hex, 1:3)

Smp.: 184-185 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.48-7.46 (d, J = 3.3 Hz, 2H, -Aryl-H), 6.86-6.84 (d, J = 3.3 Hz, 2H, -Aryl-H), 4.29 (s, 3H, -N-CH₃), 3.96 (s, 3H, -O-CH₃)

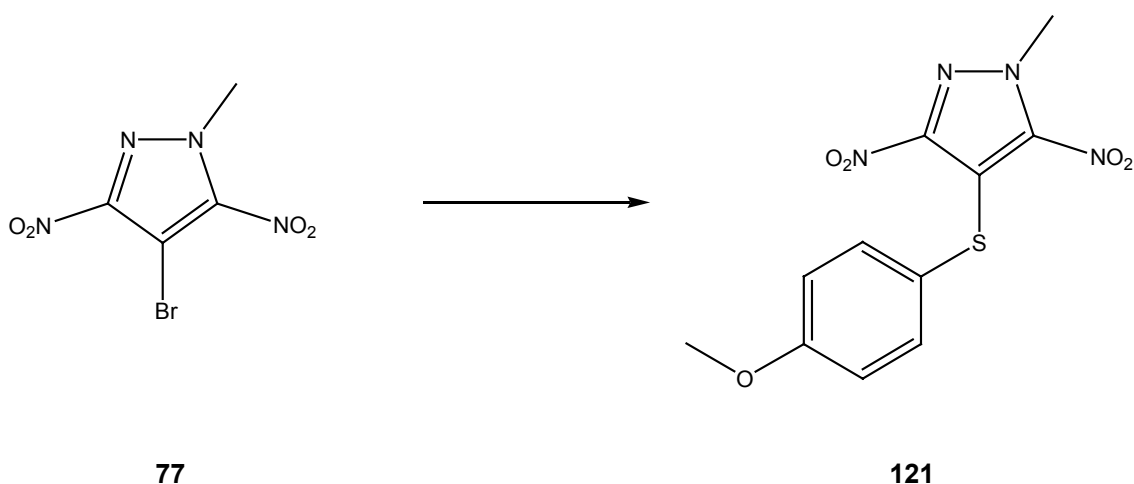
IR (KBr): ν = 2946 (w), 2838 (w), 1594 (m), 1550 (s), 1528 (m), 1493 (s), 1462 (m), 1440 (m), 1402 (s), 1317 (s), 1286 (m), 1245 (s), 1184 (m), 1152 (w), 1112 (w), 1026 (m), 876 (m), 826 (s), 756 (m), 637 (w), 521 (w)

Elementaranalyse (%) für C₁₁H₁₀N₄O₆ (294.22):

Berechnet: C 44.90 H 3.43 N 19.04

Gefunden: C 45.14 H 3.36 N 18.79

9.4.25 Synthese von 4-(4-methoxyphenylthio)-1-methyl-3,5-dinitro-1H-pyrazol **121**



Zu einer Lösung von 3.50 g (25 mmol) 4-Methoxythiophenol in 25 ml THF gab man 720 mg (1.2 g einer 60 %-igen Suspension in Mineralöl, 30 mmol) NaH in kleinen Portionen hinzu. Nach der Beendigung der Gasentwicklung tropfte man 2.04 g (8 mmol) 4-Brom-1-methyl-3,5-dinitropyrazol **77**, gelöst in 20 ml THF über einen Zeitraum von 20 min hinzu. Man ließ für 3 hiterrühren. Daraufhin wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand an 10 g Kieselgel adsorbiert. Die Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (EtOAc/Hex, 1:5). Man erhielt einen rotbraunen Feststoff, der aus MeOH umkristallisiert **121** in Form roter Kristalle lieferte.

Ausbeute: 1.12 g (45%)

R_f-Wert: 0.5 (EtOAc/Hex, 1:5)

Smp.: 145-147 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.42-7.40 (d, J = 3.3 Hz, 2H, -Aryl-*H*), 6.95-6.94 (d, J = 3.3 Hz, 2H, -Aryl-*H*), 4.28 (s, 3H, -N-CH₃), 3.76 (s, 3H, -O-CH₃)

IR (KBr): ν = 3004 (w), 2971 (w), 2837 (w), 1607 (s), 1586 (s), 1501 (s), 1466 (m), 1440 (s), 1395 (w), 1364 (w), 1329 (s), 1245 (s), 1216 (s), 1181 (s), 1110 (m), 1058 (m), 1229 (m), 914 (w), 842 (m), 831 (m), 822 (s), 787 (m), 727 (m), 671 (w), 644 (w), 606 (w)

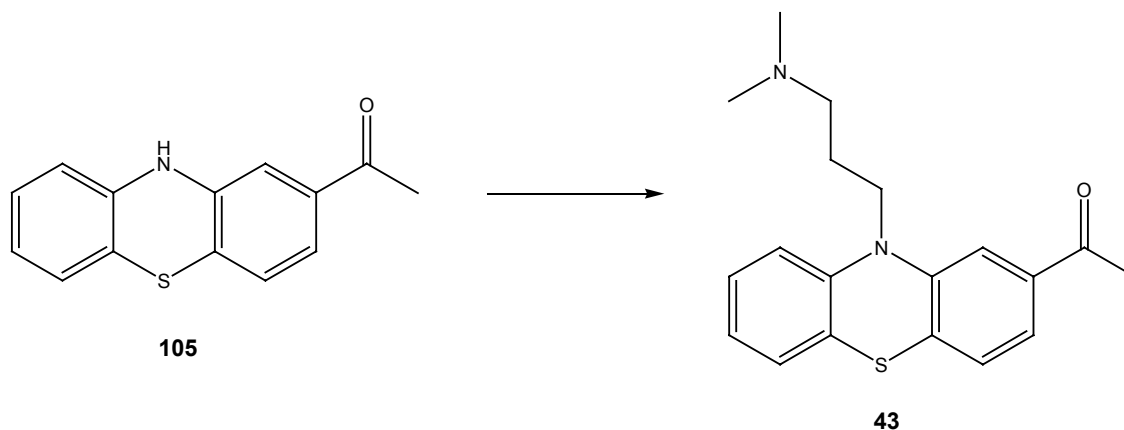
Elementaranalyse (%) für C₁₁H₁₀N₄O₅S (310.29):

Berechnet: C 42.58 H 3.25 N 18.06

Gefunden: C 42.35 H 2.98 N 17.82

9.5 Synthese von Acetylpromazin und Derivaten

9.5.1 Synthese von Acetylpromazin 43



Zu einer Lösung von 5.00 g (20.72 mmol) **105** in 100 ml DMF wurden portionsweise bei Raumtemperatur 597 mg (995 mg einer 60 %-igen Suspension in Mineralöl, 24.86 mmol) NaH hinzugegeben. Nach Beendigung der Gasentwicklung gab man 3.60 g (22.8 mmol) 3-Dimethylamino-1-propylchlorid-hydrochlorid, gelöst in 30 ml DMF, tropfenweise über einen Zeitraum von 15 min hinzu. Man ließ 12 hiterrühren, gab die Lösung dann auf 500 ml salzsaures Eiswasser und extrahierte dreimal mit jeweils 100 ml EtOAc. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, wobei ein braunes Öl zurückblieb. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch (EtOAc/Hex, 5:1) an 120 g Kieselgel, wodurch **43** als dunkelgelbes Öl erhalten wurde.

Ausbeute: 4.09 g (60%)

R_f-Wert: 0.3 (EtOAc/Hex, 5:1)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.56-7.5 (d, 1H, J = 7.8 Hz, -*H*³-Aromat), 7.53 (s, 1H, -*H*¹-Aromat), 7.52-6.93 (m, 5H, -*H*^{4,5,6,7,8}-Aromat), 3.98-3.92 (t, 2H,

$J = 6.1 \text{ Hz}$, $-\alpha\text{-CH}_2$), 2.56 (s, 3H, -Acetyl- CH_3), 2.34-2.28 (t, 2H, $J = 6.5 \text{ Hz}$, $-\text{CH}_2\text{-NMe}_2$), 2.29 (s, 3H, -Acetyl- CH_3), 1.85-1.77 (m, 2H, $-\beta\text{-CH}_2$)

IR (NaCl, Film): $\nu = 2942 \text{ (w)}$, 2858 (w) , 2816 (w) , 2764 (w) , 1679 (s) , 1592 (m) , 1560 (m) , 1461 (s) , 1416 (s) , 1357 (w) , 1275 (m) , 1227 (s) , 1109 (w) , 1039 (w) , 969 (w) , 922 (w) , 881 (w) , 811 (w) , 750 (s) , 636 (m)

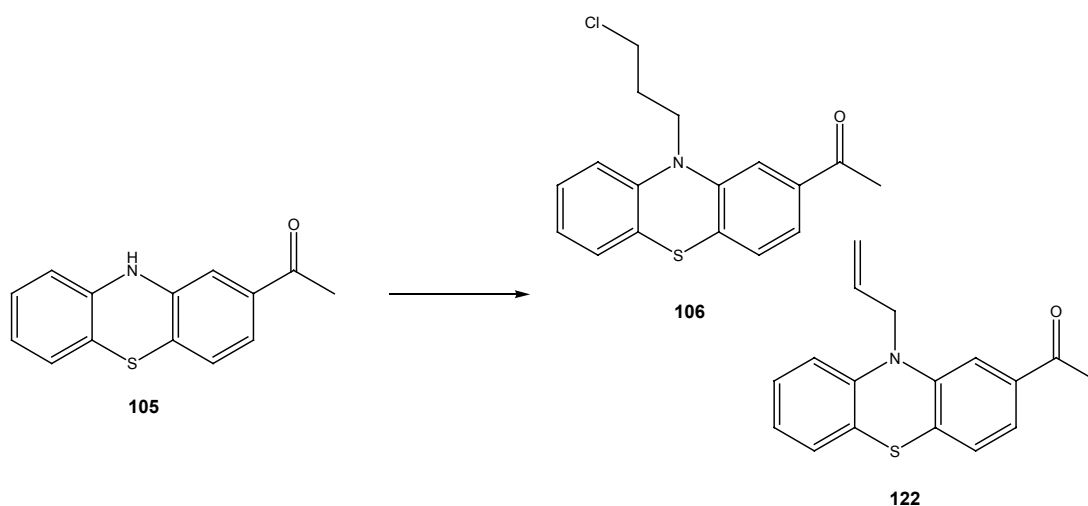
M ($\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{OS}$): berechnet: 326.46; MS (MALDI⁺) m/z (%) = 326.92 (100 %, M + H⁺)

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{OS} \times 1.5 \text{ H}_2\text{O}$ (353.49):

Berechnet: C 64.56 H 7.13 N 7.92

Gefunden: C 64.43 H 6.87 N 7.49

9.5.2 Synthese von 1-(10-(3-chloropropyl)-10H-phenothiazin-8-yl)ethanon **106**¹⁴⁰



Zu einer Lösung von 5.00 g (20.72 mmol) **105** in 100 ml DMF wurden portionsweise bei Raumtemperatur 597 mg (995 mg einer 60 %-igen Suspension in Mineralöl, 24.86 mmol) NaH hinzugegeben. Nach Beendigung

der Gasentwicklung gab man zu der schwarzen Lösung tropfenweise über einen Zeitraum von 5 min 3.59 g (2.24 ml, 22.8 mmol) 1-Brom-3-chlor-propan, gelöst in 10 ml DMF hinzu. Nachdem die Lösung für 24 h gerührt wurde, gab man sie auf 500 ml salzsaures Eiswasser und extrahierte fünfmal mit jeweils 100 ml EtOAc. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über MgSO_4 getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das zurückbleibende braune Öl in 50 ml MeOH aufgenommen und an 30 g Kieselgel adsorbiert. Anschließende Säulenchromatographie (EtOAc/Hex, 1:5) an 300 g Kieselgel ergaben Mischfraktionen aus **106** und **122**. Durch eine zweite säulenchromatographische Aufreinigung (EtOAc/Hex, 1:8) gelang die Trennung der beiden Produkte voneinander und man erhielt **106** und **122** in Form gelber Öle.

Verbindung 106:

Ausbeute: 5.29 g (81%)

R_f-Wert: 0.5 (EtOAc/Hex, 1:5)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.38-7.37 (d, 1H, J = 7.9 Hz, $-H^3$ -Aromat), 7.34 (s, 1H, $-H^1$ -Aromat), 7.16-6.78 (m, 5H, $-H^{4,5,6,7,8}$ -Aromat), 4.02-3.97 (t, 2H, J = 6.5 Hz, $-\text{Cl}-\text{CH}_2$), 3.57-3.51 (t, 2H, J = 6.2 Hz, $-\alpha-\text{CH}_2$), 2.45 (s, 3H, $-\text{Acetyl}-\text{CH}_3$), 2.16-2.06 (m, 2H, $-\beta-\text{CH}_2$)

IR (NaCl, Film): ν = 3443 (m), 2943 (m), 2816 (m), 2764 (m), 1679 (s), 1592 (s), 1560 (s), 1461 (s), 1415 (s), 1357 (m), 1328 (m), 1274 (m), 1227 (s), 1153 (w), 1131 (w), 1109 (w), 1038 (m), 922 (w), 810 (w), 750 (m), 636 (w)

Elementaranalyse (%) für C₁₇H₁₆ClNOS (317.83):

Berechnet: C 64.24 H 5.07 N 4.41

Gefunden: C 64.89 H 4.89 N 4.41

Verbindung 122:**Ausbeute:** 502 mg (11%)**R_f-Wert:** 0.45 (EtOAc/Hex, 1:5)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 7.53-7.49 (d, 1H, J = 7.9 Hz, -H³-Aromat), 7.34 (s, 1H, -H¹-Aromat), 7.23-6.89 (m, 5H, -H^{4,5,6,7,8}-Aromat), 6.07-5.91 (m, 1H, -CH=CH₂), 5.33-5.16 (m, 2H, -CH=CH₂), 4.55-4.53 (d, 2H, J = 2.1 Hz, - α -CH₂), 2.51 (s, 3H, -Acetyl-CH₃)

¹³C-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 196.6 (-C=O), 143.8 (-C^{9a}-Aromat), 143.3 (-C^{8a}-Aromat), 136.0 (-C²-Aromat), 132.8 (-CH=CH₂), 128.7 (-C⁴-Aromat), 127.9 (-C⁵-Aromat), 126.6 (-C⁷-Aromat), 126.4 (-C^{4a}-Aromat), 122.9 (-C⁸-Aromat), 122.7 (-C^{10a}-Aromat), 120.7 (-C⁶-Aromat), 117.3 (-C³-Aromat), 115.8 (-C¹-Aromat), 113.9 (-CH=CH₂), 50.2 (- α -CH₂), 26.6 (-Acetyl-CH₃)

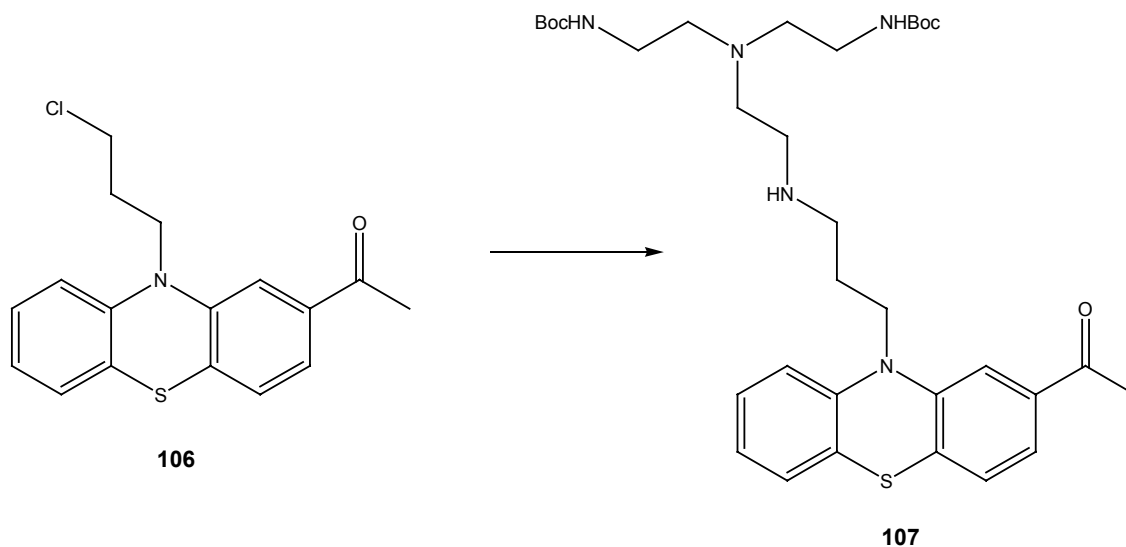
IR (NaCl, Film): ν = 2956 (m), 2875 (m), 2644 (m), 1678 (s), 1592 (s), 1559 (m), 1490 (m), 1467 (s), 1444 (s), 1415 (s), 1358 (m), 1343 (m), 1311 (m), 1277 (s), 1229 (s), 1131 (m), 1045 (m), 987 (w), 923 (m), 887 (w), 808 (w), 748 (s), 669 (w), 632 (m)

Elementaranalyse (%) für C₁₇H₁₅NOS (281.37):

Berechnet: C 72.57 H 5.37 N 4.98

Gefunden: C 72.97 H 5.22 N 4.97

9.5.3 Synthese von {2-[{2-[3-(2-Acetyl-phenotiazin-10-yl)-propylamino]-ethyl}-(2-*tert*-butoxycarbonylamino-ethyl)-amino]-ethyl}-carbaminsäure-*tert*-butylester **107**



In einem Rundkolben wurden 2.76 g (8.68 mmol) **106** und 3.46 g (10 mmol) Bisbocamin **119** in 60 ml DMF gelöst. Zu dieser Lösung gab man 2.76 g (20 mmol) K_2CO_3 und erhitze für 16 h unter Rückfluss zum Sieden. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Kugelrohr entfernt. Der gelbbraune Rückstand wurde in 250 ml EtOAc aufgenommen und zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet, vom Trockenmittel befreit und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (EtOAc/Hex, 5:1) ergab **107** in Form eines gelben Öls.

Ausbeute: 3.06 g (56%)

R_f-Wert: 0.3 (EtOAc/Hex, 5:1)

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ = 7.96 (bs, 1H, -NH), 7.58-7.57 (d, 1H, J = 1.3 Hz, $-\text{H}^3$ -Aromat), 7.54 (s, 1H, $-\text{H}^1$ -Aromat), 7.45-6.98 (m, 5H, $-\text{H}^{4,5,6,7,8}$ -Aromat), 6.68 (bs, 2H, Boc-NH) 4.09-3.99 (m, 6H, Acetylpromazin-NH- CH_2 - CH_2 - CH_2 -NHBoc), 2.94-2.90 (m, 6H, $-\text{CH}_2$), 2.42 (s, 3H, -Acetyl- CH_3), 1.36 (s, 18H, Boc- CH_3)

IR (KBr): ν = 2924 (w), 2872 (w), 1679 (s), 1592 (m), 1560 (m), 1461 (s), 1416 (s), 1357 (w), 1274 (m), 1226 (s), 1118 (m), 1039 (w), 883 (w), 813 (w), 750 (m), 636 (w)

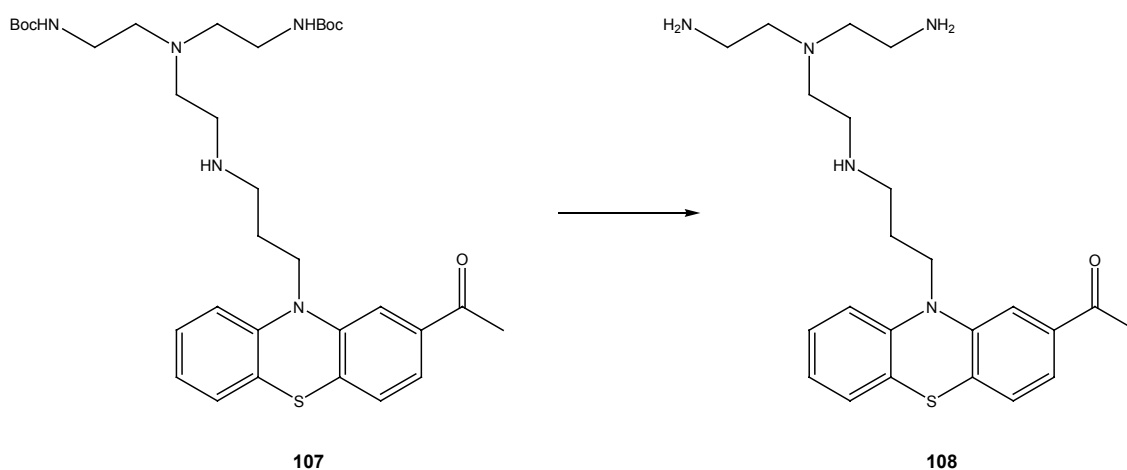
M ($\text{C}_{33}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}$): berechnet: 627.84; MS (MALDI $^-$) m/z (%) = 626.35 (100%, M - H^+)

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_{33}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}$ (627.84):

Berechnet: C 63.13 H 7.87 N 11.15

Gefunden: C 62.86 H 7.55 N 11.41

9.5.4 Synthese von 1-[10-(3-{2-[Bis-(2-amino-ethyl)-amino]-ethylamino}-propyl)-10H-phenothiazin-2-yl]-ethanon 108



In einem Schlenkkolben wurden 2.52 g (4.01 mmol) **107** in 30 ml EtOH gelöst. Unter Rühren gab man bei 0 °C tropfenweise 4.76 g (2.9 ml, 40 mmol) Thionylchlorid hinzu. Man ließ zunächst für 5 h bei 0 °Citerrühren, anschließend über Nacht bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der schwarze Rückstand in 50 ml MeOH aufgenommen und mit 40 ml Diethylether bis zur einsetzenden Trübung versetzt. Die Lösung wurde über Nacht bei 4 °C stehengelassen. Der Ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Man erhielt das Hydrochlorid von **108** in Form eines gelben Feststoffs.

Ausbeute: 1.31 g (76%)

R_f-Wert: 0.2 (EE/MeOH 9:1)

Smp.: 280-282 °C

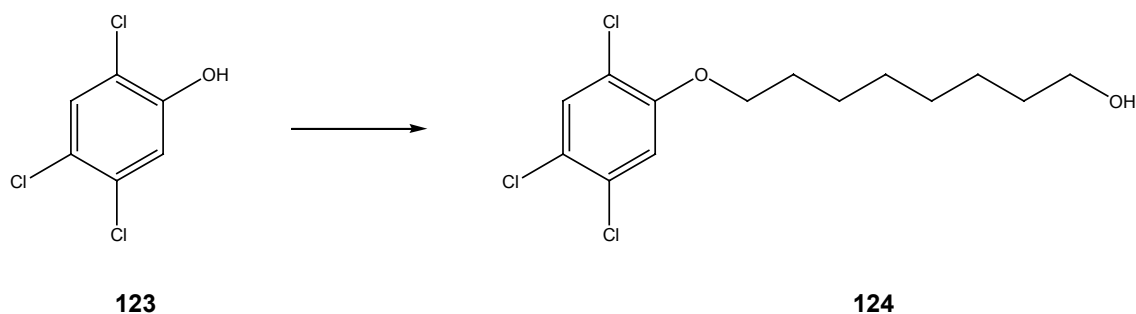
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 10.25 (bs, 1H, -NH), 8.54 (bs, 6H, -NH₃⁺), 7.55-7.52 (d, 1H, J = 8.3 Hz, -H³-Aromat), 7.43-6.98 (m, 5H, -H^{4,5,6,7,8}-Aromat), 4.15-4.09 (m, 2H, Acetylpromazin-NH-CH₂-), 3.17 (s, 3H, -Acetyl-CH₃), 3.36-2.56 (m, 16H, -CH₂)

IR (KBr): ν = 3390 (m), 3135 (s), 3047 (s), 1676 (w), 1618 (w), 1508 (w), 1459 (m), 1406 (s), 1305 (w), 1229 (w), 1130 (s), 753 (w), 671 (w), 600 (w)

M (C₂₃H₃₃N₅OS): berechnet: 427.61; MS (MALDI⁺) m/z (%) = 427.54 (100%, M + H⁺)

9.6 Synthese der Tag-Verbindungen für Kombinatorische Bibliotheken

9.6.1 Synthese des Tag-Alkohols 2,4,5-Cl₃C₈ 124



In einem 200 ml Rundkolben mit aufgesetztem Rückflusskühler wurden 2.29 g (11.6 mmol) 2,4,5-Trichlorphenol **123** und 2.00 g (9.6 mmol) 8-Bromooctanol in 28 ml DMF vorgelegt. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und langsam mit 2.24 g (11.6 mmol) CsCO₃ versetzt. Anschließend wurde diese Lösung für 2.5 h bei 80°C unter Rühren erwärmt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 160 ml Toluol. Die Lösung wurde daraufhin je zweimal mit 50 ml 0.5 M NaOH, 50 ml 1 M HCl und 50 ml dest. Wasser gewaschen. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erfolgte eine säulenchromatographische Aufreinigung (EtOAc/Hex 1:1). Man erhielt ein farblosen Feststoff von **124**.

Ausbeute: 2.47 g (79%)

R_f-Wert: 0.3 (EtOAc/Hex 1:1)

Smp.: 47-48 °C

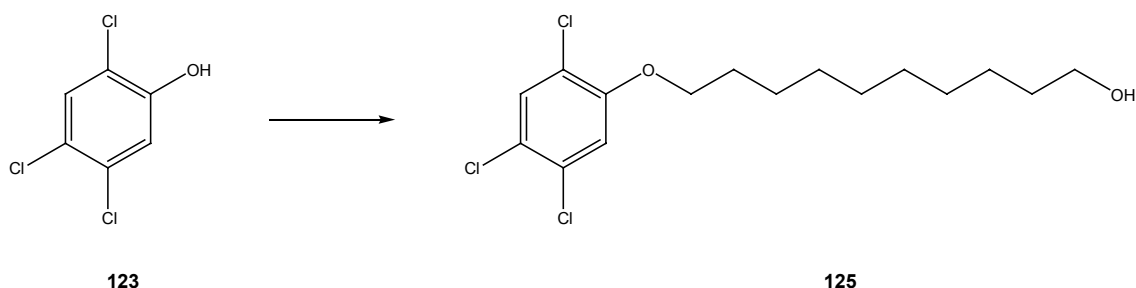
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): 7.80 (s, 1H, $-H^3\text{-Aromat}$), 7.45 (s, 1H, $-H^6\text{-Aromat}$), 4.38-4.40 (t, 1H, $J = 5.2$ Hz, $-\text{OH}$), 4.12-4.05 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz, $-\text{O-CH}_2\text{-}$), 3.41-3.30 (q, 2H, $J = 5.1$ Hz, $-\text{CH}_2\text{-OH}$), 1.78-1.65 (tt, 2H, $J = 7.7/6.4$ Hz, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$), 1.25-1.44 (m, 10H, $-\text{CH}_2\text{-}$)

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{Cl}_3\text{O}_2$ (325.66):

Berechnet: C 51.63 H 5.88

Gefunden: C 51.82 H 5.94

9.6.2 Synthese des Tag-Alkohols 2,4,5- Cl_3C_{10} 125



In einem 200 ml Rundkolben mit aufgesetztem Rückflusskühler wurden 2.1 g (10.6 mmol) 2,4,5-Trichlorphenol **123** und 2.00 g (8.4 mmol) 10-Bromdecanol in 18 ml DMF vorgelegt. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und langsam mit 2.04 g (10.6 mmol) CsCO_3 versetzt. Anschließend wurde diese Lösung für 3 h bei 80°C unter Rühren erwärmt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 160 ml Toluol. Die Lösung wurde daraufhin je zweimal mit 50 ml 0.5 M NaOH, 50 ml 1 M HCl und 50 ml dest. Wasser gewaschen. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erfolgte eine säulenchromatographische Aufreinigung (EtOAc/Hex 1:1). Man erhielt ein farblosen Feststoff von **125**.

Ausbeute: 2.41 g (81%)

R_f-Wert: 0.3 (EtOAc/Hex 1:1)

Smp.: 50-51 °C

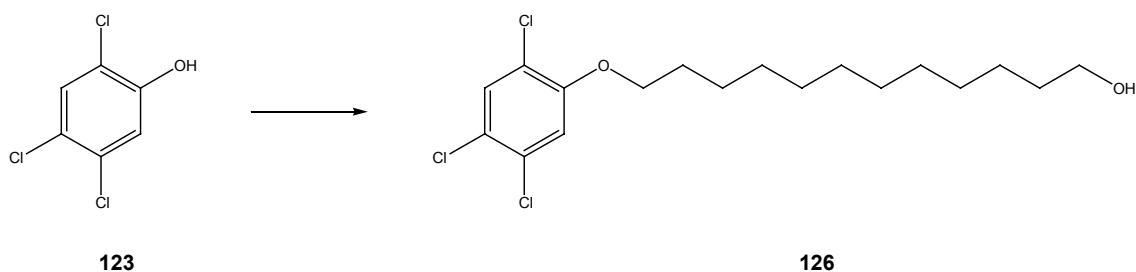
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): 7.78 (s, 1H, -H³-Aromat), 7.41 (s, 1H, -H⁶-Aromat), 4.36-4.48 (t, 1H, J = 5.3 Hz, -OH), 4.12-4.05 (t, 2H, J = 6.1 Hz, -O-CH₂-), 3.41-3.30 (q, 2H, J = 5.1 Hz, -CH₂-OH), 1.78-1.65 (tt, 2H, J = 7.8/6.5 Hz, -O-CH₂-CH₂-), 1.25-1.44 (m, 14H, -CH₂)

Elementaranalyse (%) für C₁₆H₂₃Cl₃O₂ (353.71):

Berechnet: C 54.33 H 6.55

Gefunden: C 54.58 H 6.63

9.6.3 Synthese des Tag-Alkohols 2,4,5-Cl₃C₁₂ 126



In einem 200 ml Rundkolben mit aufgesetztem Rückflusskühler wurden 2.10 g (10.6 mmol) 2,4,5-Trichlorphenol **123** und 2.12 g (8 mmol) 12-Bromdodecanol in 22 ml DMF vorgelegt. Die Lösung wurde im Eisbad auf 0 °C gekühlt und langsam mit 2.04 g (10.6 mmol) CsCO₃ versetzt. Anschließend wurde diese Lösung für 3 h bei 80°C unter Rühren erwärmt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 160 ml Toluol. Die Lösung wurde daraufhin je zweimal mit 50 ml 0.5 M NaOH, 50 ml 1 M HCl und 50 ml dest. Wasser gewaschen. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum

erfolgte eine säulenchromatographische Aufreinigung (EtOAc/Hex 1:1). Man erhielt **126** als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 2.63 g (86%)

R_f-Wert: 0.4 (EtOAc/Hex 1:1)

Smp.: 48-51 °C

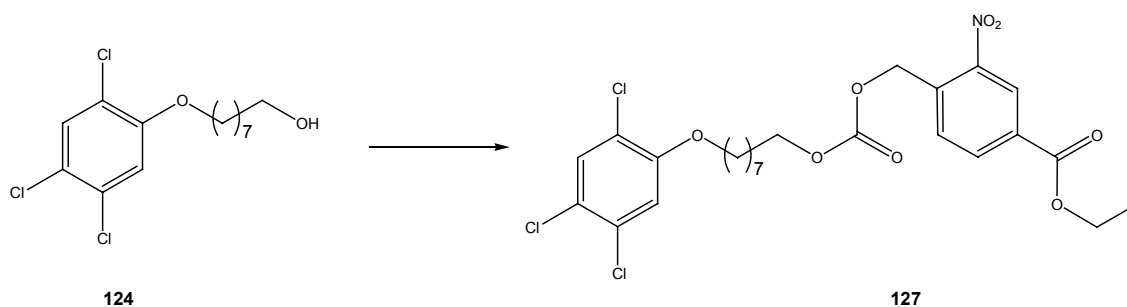
¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): 7.76 (s, 1H, -H³-Aromat), 7.43 (s, 1H, -H⁶-Aromat), 4.35-4.48 (t, 1H, J = 5.1 Hz, -OH), 4.11-4.05 (t, 2H, J = 6 Hz, -O-CH₂-), 3.41-3.30 (q, 2H, J = 5.1 Hz, -CH₂-OH), 1.78-1.65 (tt, 2H, J = 7.8/6.5 Hz, -O-CH₂-CH₂-), 1.25-1.44 (m, 18H, -CH₂)

Elementaranalyse (%) für C₁₈H₂₇Cl₃O₂ (381.76):

Berechnet: C 56.63 H 7.13

Gefunden: C 56.84 H 7.38

9.6.4 Synthese der geschützten Tagverbindung Cl₃C₈ 127



Zu einer Lösung von 742 mg Phosgen in Toluol (7.50 mmol, 4 ml einer 20-%igen Lösung) gab man bei 0 °C tropfenweise 2.20 g (6.8 mmol) des Alkohols **124**, gelöst in 3 ml Toluol hinzu. Man ließ für 30 min bei 0°C, dann für weitere 30 min bei Raumtemperatur rühren. Anschließend wurde das Lösungsmittel sowie überschüssiges Phosgen im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand

wurde in 30 ml DCM aufgenommen und mit 1.61 g (6.80 mmol) des Nitroaromaten versetzt. Daraufhin ließ man über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Die Lösung wurde dann dreimal mit je 5 ml dest. Wasser gewaschen, die organische Phase im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und säulenchromatographisch (EtOAc/Hex 1:5) aufgereinigt. Man erhielt **127** in Form eines blassgelben Feststoffs.

Ausbeute: 3.64 g (91%)

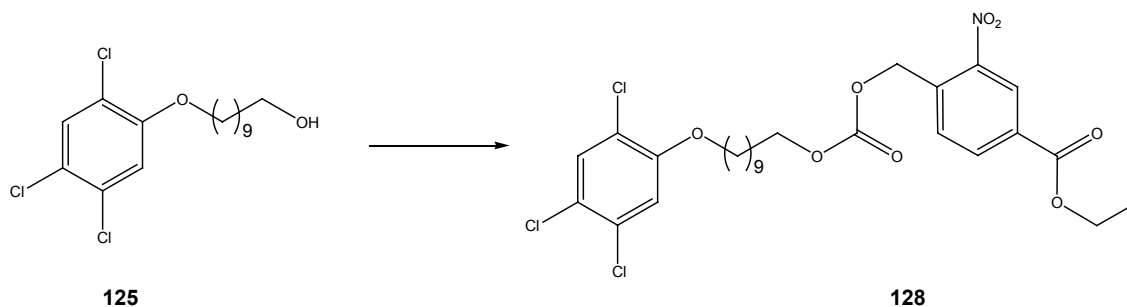
R_f-Wert: 0.6 (EtOAc/Hex 1:5)

Smp.: 49-50 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): 8.57 (s, 1H, -H²-Nitroaromat), 8.36-8.33 (d, 1H, J = 8.2 Hz, -H⁶-Nitroaromat), 7.85-7.82 (d, 1H, J = 8.2 Hz, -H⁵-Nitroaromat), 7.77 (s, 1H, -H³-Chloraromat), 7.43 (s, 1H, -H⁶-Chloraromat), 6.12-6.01 (m, 1H, -CH=CH₂), 5.57 (s, 2H, -CH₂-Benzyl), 5.46-5.29 (dd, 2H, J = 17.2/3.3 Hz, -CH=CH₂), 4.88-4.86 (d, 2H, J = 5.5 Hz, -CH₂-Allyl), 4.17-4.06 (m, 4H, -CH₂-O-), 1.72-1.62 (m, 4H, -CH₂-CH₂-O-), 1.55-1.32 (m, 6H, -CH₂)

IR (KBr): ν = 3096 (m), 2935 (s), 2858 (s), 2363 (w), 1753 (s), 1649 (w), 1625 (m), 1584 (m), 1538 (s), 1482 (s), 1460 (s), 1394 (m), 1352 (s), 1198 (m), 1156 (m), 1133 (s), 1079 (s), 1019 (m), 976 (m), 875 (m), 850 (w), 832 (w), 790 (m), 773 (m), 745 (s), 680 (m)

9.6.5 Synthese der geschützten Tagverbindung Cl₃C₁₀ 128



Zu einer Lösung von 643 mg Phosgen in Toluol (6.50 mmol, 3.5 ml einer 20-%igen Lösung) gab man bei 0 °C tropfenweise 2.10 g (5.9 mmol) des Alkohols **125**, gelöst in 3 ml Toluol hinzu. Man ließ für 30 min bei 0°C, dann für weitere 30 min bei Raumtemperatur rühren. Anschließend wurde das Lösungsmittel sowie überschüssiges Phosgen im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wurde in 30 ml DCM aufgenommen und mit 1.40 g (5.90 mmol) des Nitroaromaten versetzt. Daraufhin ließ man über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Die Lösung wurde dann dreimal mit je 5 ml dest. Wasser gewaschen, die organische Phase im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/Hex 1:5). Man erhielt **128** in Form eines blassgelben Feststoffs.

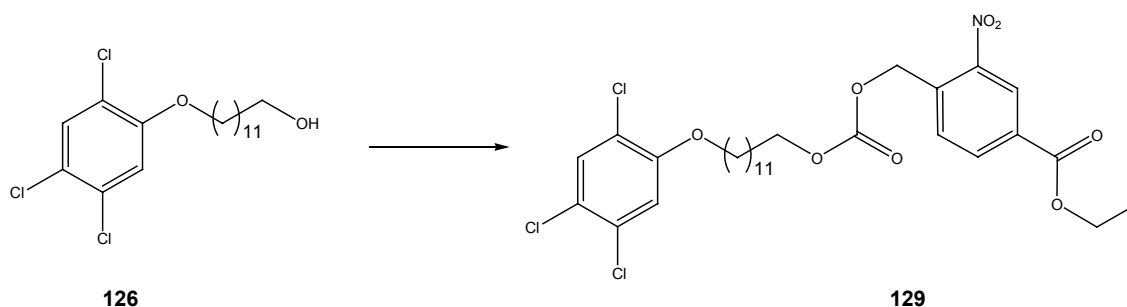
Ausbeute: 3.38 g (93%)

R_f-Wert: 0.7 (EtOAc/Hex 1:5)

Smp.: 51-53 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): 8.57 (s, 1H, -H²-Nitroaromat), 8.37-8.33 (d, 1H, J = 8.2 Hz, -H⁶-Nitroaromat), 7.85-7.82 (d, 1H, J = 8.2 Hz, -H⁵-Nitroaromat), 7.76 (s, 1H, -H³-Chloraromat), 7.43 (s, 1H, -H⁶-Chloraromat), 6.14-6.01 (m, 1H, -CH=CH₂), 5.57 (s, 2H, -CH₂-Benzyl), 5.47-5.28 (dd, 2H, J = 17.2/3.3 Hz, -CH=CH₂), 4.88-4.85 (d, 2H, J = 5.4 Hz, -CH₂-Allyl), 4.16-4.04 (m, 4H, -CH₂-O-), 1.74-1.61 (m, 4H, -CH₂-CH₂-O-), 1.55-1.27 (m, 10H, -CH₂)

IR (KBr): ν = 3096 (m), 2931 (s), 2856 (s), 1752 (s), 1649 (w), 1625 (m), 1584 (m), 1538 (s), 1459 (s), 1394 (s), 1353 (s), 1248 (s), 1156 (m), 1132 (s), 1079 (s), 976 (s), 874 (m), 850 (w), 832 (m), 790 (w), 773 (w), 745 (s), 680 (m)

9.6.6 Synthese der geschützten Tagverbindung Cl₃C₁₂ 129

Zu einer Lösung von 647 mg Phosgen in Toluol (6.60 mmol, 3.6 ml einer 20-%igen Lösung) gab man bei 0 °C tropfenweise 2.30 g (6.00 mmol) des Alkohols **126**, gelöst in 3 ml Toluol hinzu. Man ließ für 30 min bei 0°C, dann für weitere 30 min bei Raumtemperatur rühren. Anschließend wurde das Lösungsmittel sowie überschüssiges Phosgen im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wurde in 30 ml DCM aufgenommen und mit 1.42 g (6 mmol) des Nitroaromaten versetzt. Daraufhin ließ man über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Die Lösung wurde dann dreimal mit je 5 ml dest. Wasser gewaschen, die organische Phase im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und säulenchromatographisch (EtOAc/Hex 1:5) aufgereinigt. Man erhielt **129** in Form eines blass-gelben Feststoffs.

Ausbeute: 3.40 g (88%)

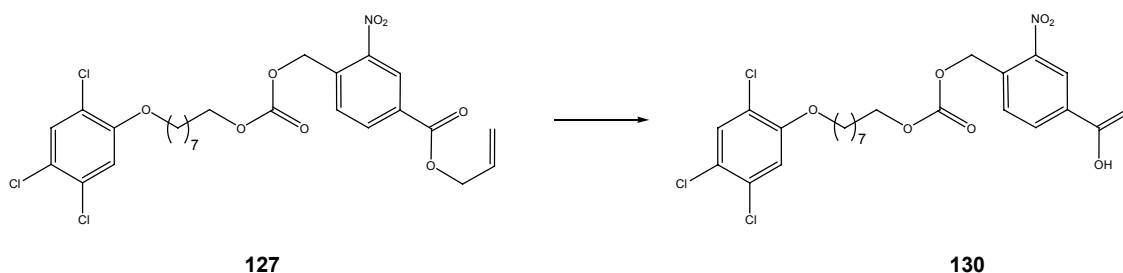
R_f-Wert: 0.4 (EtOAc/Hex 1:8)

Smp.: 52-53 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): 8.56 (s, 1H, -H²-Nitroaromat), 8.35-8.31 (d, 1H, J = 8.1 Hz, -H⁶-Nitroaromat), 7.84-7.81 (d, 1H, J = 8.2 Hz, -H⁵-Nitroaromat), 7.73 (s, 1H, -H³-Chloraromat), 7.40 (s, 1H, -H⁶-Chloraromat), 6.14-6.01 (m, 1H, -CH=CH₂), 5.56 (s, 2H, -CH₂-Benzyl), 5.46-5.29 (dd, 2H, J = 17.2/3.3 Hz, -CH=CH₂), 4.88-4.85 (d, 2H, J = 5.4 Hz, -CH₂-Allyl), 4.15-4.03 (m, 4H, -CH₂-O-), 1.73-1.57 (m, 4H, -CH₂-CH₂-O-), 1.55-1.23 (m, 14H, -CH₂)

IR (KBr): ν = 3096 (w), 2927 (s), 2855 (s), 2378 (w), 1753 (s), 1731 (s), 1649 (w), 1625 (m), 1584 (m), 1538 (s), 1482 (s), 1463 (s), 1394 (m), 1352 (s), 1253 (s), 1198 (m), 1156 (m), 1132 (s), 1079 (s), 1019 (m), 977 (s), 874 (m), 850 (w), 832 (w), 790 (w), 773 (w), 745 (s), 680 (m)

9.6.7 Synthese der Tagverbindung Cl_3C_8 130



3.30 g (5.60 mmol) des Allylesters **127** wurden in 40 ml THF gelöst. Zu dieser Lösung gab man 650 mg (0.56 mmol) $\text{Pd}[\text{PPh}_3]_4$ und 4.9 ml (56 mmol) Morpholin. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, daraufhin das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der verbliebene Rückstand wurde zweimal mit jeweils 20 ml 2 M HCl gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und anschließend im Vakuum das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (EtOAc/Hex 1:1) aufgereinigt. Man erhielt **130** in Form eines weißen Feststoffes.

Ausbeute: 2.55 g (83%)

R_f -Wert: 0.3 (EtOAc/Hex 1:1)

Smp.: 74-75 °C

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ = 13.73 (bs, 1H, -COOH), 8.56 (s, 1H, - H^2 -Nitroaromat), 8.32-8.28 (d, 1H, J = 8 Hz, - H^6 -Nitroaromat), 7.81-7.78 (d, 1H, J = 8.4 Hz, - H^5 -Nitroaromat), 7.74 (s, 1H, - H^3 -Chloraromat), 7.43 (s, 1H, - H^6 -

Chloraromat), 5.56 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-Benzyl}$), 4.16-4.01 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{-O-}$), 1.75-1.63 (m, 4H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$), 1.59-1.23 (m, 6H, $-\text{CH}_2$)

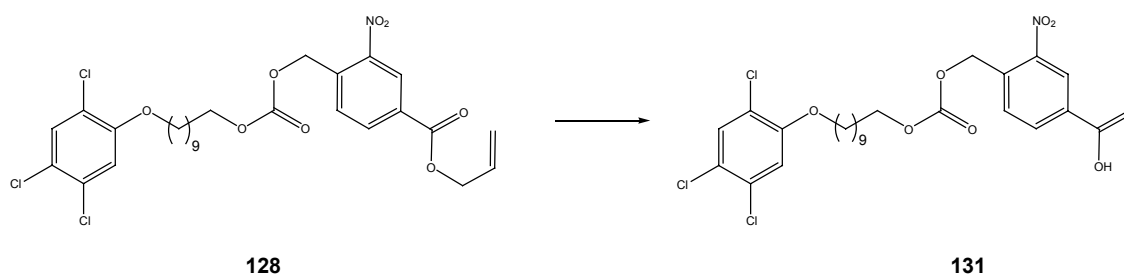
IR (KBr): ν = 3098 (m), 2936 (s), 2858 (m), 1749 (s), 1704 (s), 1626 (m), 1584 (w), 1539 (s), 1482 (s), 1462 (s), 1423 (m), 1372 (m), 1352 (s), 1252 (s), 1135 (m), 1079 (s), 1045 (w), 1021 (w), 961 (w), 874 (w), 817 (w), 790 (w), 744 (w), 680 (m)

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{Cl}_3\text{NO}_8$ (548.80):

Berechnet: C 50.34 H 4.41 N 2.55

Gefunden: C 50.57 H 4.52 N 2.73

9.6.8 Synthese der Tagverbindung Cl_3C_{10} **131**



3.00 g (4.90 mmol) des Allylesters **128** wurden in 40 ml THF gelöst. Zu dieser Lösung gab man 570 mg (0.49 mmol) $\text{Pd}[\text{PPh}_3]_4$ und 4.3 ml (49 mmol) Morpholin. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, daraufhin das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der verbliebene Rückstand wurde zweimal mit jeweils 20 ml 2 M HCl gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und anschließend im Vakuum das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (EtOAc/Hex 1:1) aufgereinigt. Man erhielt **131** in Form eines weißen Feststoffes.

Ausbeute: 2.23 g (79%)

R_f-Wert: 0.3 (EtOAc/Hex 1:1)

Smp.: 75-77 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 13.56 (bs, 1H, -COOH), 8.53 (s, 1H, -H²-Nitroaromat), 8.27-8.25 (d, 1H, J = 8 Hz, -H⁶-Nitroaromat), 7.75 (s, 1H, -H³-Chloraromat), 7.71-7.69 (d, 1H, J = 8 Hz, -H⁵-Nitroaromat), 7.43 (s, 1H, -H⁶-Chloraromat), 5.52 (s, 2H, -CH₂-Benzyl), 4. (m, 2H, -CH₂-CH₂-O-Chloraromat), 1.4-4.07 (m, 4H, -CH₂-O-), 1.76-1.69 (m, 2H, -CH₂-CH₂-O-Nitroaromat), 1.63-1.59, 1.57-1.28 (m, 6H, -CH₂)

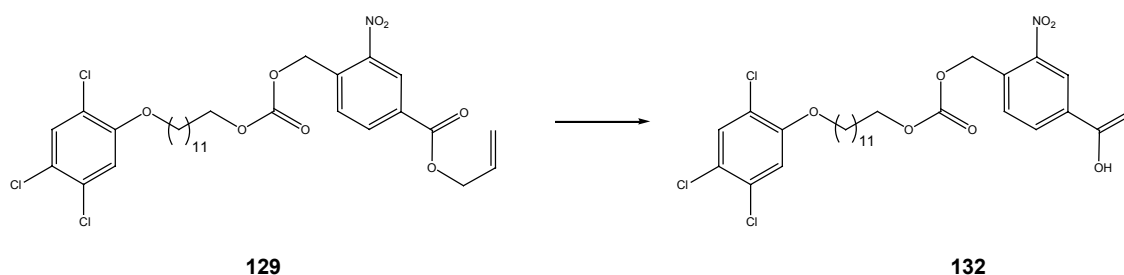
IR (KBr): ν = 3104 (s), 2938 (s), 2861 (m), 1753 (s), 1706 (s), 1628 (s), 1584 (w), 1539 (s), 1483 (s), 1464 (m), 1428 (m), 1380 (m), 1352 (s), 1252 (s), 1135 (m), 1079 (s), 1045 (w), 1021 (w), 959 (w), 872 (w), 817 (w), 790 (w), 744 (w), 680 (m)

Elementaranalyse (%) für C₂₅H₂₈Cl₃NO₈ (576.85):

Berechnet: C 52.05 H 4.89 N 2.43

Gefunden: C 52.25 H 4.98 N 2.65

9.6.9 Synthese der Tagverbindung Cl₃C₁₂ 132



3.10 g (4.80 mmol) des Allylesters **129** wurden in 40 ml THF gelöst. Zu dieser Lösung gab man 560 mg (0.48 mmol) Pd[PPh₃]₄ und 4.3 ml (48 mmol) Morpholin. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, daraufhin das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der verbliebene Rückstand

wurde zweimal mit jeweils 20 ml 2 M HCl gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und anschließend im Vakuum das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (EtOAc/Hex 1:1) aufgereinigt. Man erhielt **132** in Form eines weißen Feststoffes.

Ausbeute: 2.44 g (84%)

R_f-Wert: 0.3 (EtOAc/Hex 1:1)

Smp.: 71-73 °C

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): δ = 13.72 (bs, 1H, -COOH), 8.54 (s, 1H, -H²-Nitroaromat), 8.31-8.28 (d, 1H, J = 8.1 Hz, -H⁶-Nitroaromat), 7.81-7.77 (d, 1H, J = 8.5 Hz, -H⁵-Nitroaromat), 7.73 (s, 1H, -H³-Chloraromat), 7.43 (s, 1H, -H⁶-Chloraromat), 5.56 (s, 2H, -CH₂-Benzyl), 4.16-4.01 (m, 4H, -CH₂-O-), 1.74-1.62 (m, 4H, -CH₂-CH₂-O-), 1.57-1.25 (m, 14H, -CH₂)

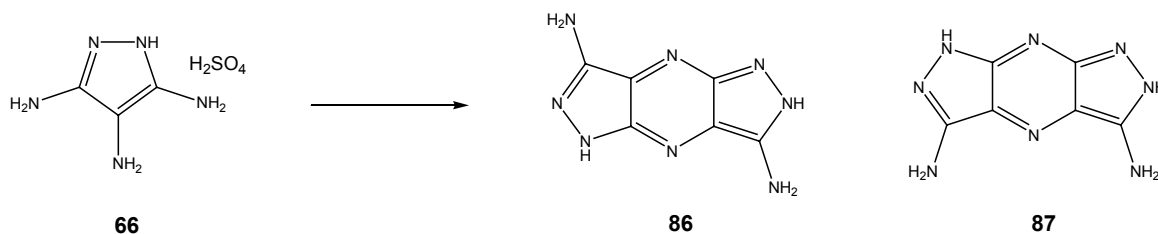
IR (KBr): ν = 2923 (s), 2854 (m), 2370 (w), 2345 (w), 1758 (s), 1686 (s), 1654 (w), 1627 (w), 1534 (m), 1467 (m), 1420 (m), 1371 (w), 1350 (m), 1258 (s), 1135 (w), 1077 (m), 998 (w), 964 (m), 930 (w), 870 (w), 792 (w), 747 (w)

Elementaranalyse (%) für C₂₇H₃₂Cl₃NO₈ (604.90):

Berechnet: C 53.61 H 5.33 N 2.32

Gefunden: C 53.84 H 5.61 N 2.44

9.7 Oxidation von Triaminopyrazol zu den Oxidationsprodukten **86** und **87**



917 mg **66** (4 mmol) wurden in 50 ml 1 N NaOH gelöst. Die Lösung wurde für 7 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Während dieser Zeit wurde ein kontinuierlicher Strom Luft durch die Lösung geleitet. Anschließend wurde die Lösung mit Salzsäure auf einen pH von 2 gebracht. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der verbleibende schwarze Rückstand in 100 ml MeOH gelöst und an 20 g Kieselgel absorbiert. Säulenchromatographische Aufreinigung (EtOAc/EtOH/ H_2O /AcOH, 20:2:2:1) ergab **86** oder **87** als farbloses Pulver. Es gelang nicht, Kristalle der isolierten Verbindung zu erhalten, daher lassen sich keine Aussagen darüber machen, welches Regioisomer isoliert werden konnte.

Ausbeute: 99 mg (13 %)

R_f-Wert: 0.4 (EtOAc/EtOH/ H_2O /AcOH, 20:2:2:1)

Smp.: 192-196 °C (Zersetzung)

^1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.72 (s, 2H, Pyrazol-NH, austauschbar mit D_2O), 3.30-3.75 (bs, 4H, $-\text{NH}_2$, unter dem H_2O -Signal, austauschbar mit D_2O)

Elementaranalyse (%) für $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_8$ (190.17):

Berechnet: C 37.90 H 3.18 N 58.92

Gefunden: C 2.27 H 0.86 N 0.50

10 Anhang

10.1 Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
Boc <i>tert</i>	Butoxycarbonyl
Cbz	Carbonyloxybenzyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DMAP	N,N-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eq	Äquivalente
ESI-MS	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
EtOAc	Ethylacetat, Essigsäureethylester
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Fluoreszenz-Resonanz Energie Transfer
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HOBt	Hydroxybenzotriazol
IC ₅₀	half inhibition concentration
IR	Infrarot
IRES	internal ribosomal entry side
LDA	Lithiumdiisopropylamid
LTR	long terminal repeats

NMR	Nuklearmagnetische Resonanz
PBS	PBS Primer binding site
RFU	Relative Fluorescence Units
RNA	Ribonukleinsäure
RRE	Rev responsive element
RT	Reverse Transkriptase, Raumtemperatur
Smp	Schmelzpunkt
TAR	<i>Trans</i> -Activation Responsive
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
UV	Ultraviolett

10.2 Kristallstrukturen

10.2.1 Kristallstruktur von Triaminopyrazol 66

Die Verbindung wurde aus schwefelsaurem Wasser umkristallisiert. Zur Kristallstrukturbestimmung wurde ein brauner, stabförmiger Kristall der Abmessung 0.06 x 0.12 x 0.68 mm vermessen.

Kristallsystem: orthorhombisch

Raumgruppe: P bca

Elementarzelle: $a = 12.852(3) \text{ \AA}$, $b = 6.8041(12) \text{ \AA}$, $c = 20.567(3) \text{ \AA}$;

$$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$$

Volumen: $1798.5(6) \text{ \AA}^3$

Berechnete Dichte: 1.693 Mg/m^3

Reflexe gemessen: 21215

Das Triaminopyrazol zeigt eine geringe Abweichung von der Planarität. Der größte Torsionswinkel in dem Fünfring ist 6.6° (2). Diese Abweichung könnte durch Effekte der Kristallpackung verursacht sein. Die Aminogruppen N3 und N5 sind annähernd koplanar zur Ringebene. Die Ammoniumgruppe N4 ist protoniert und besitzt eine tetrahedrale Konformation. Die Bindung N4-C2 ist mit einer Länge von $1.449(2) \text{ \AA}$ in etwa um 0.11 \AA länger als die Bindungen N3-C1 und N5-C3. Das Pyrazol stapelt in der kristallographischen b-Richtung. Der Winkel zwischen benachbarten Ringebenen in diesen Stapeln beträgt 6.5° . Zwischen den Ringen besteht eine geringe π - π -Wechselwirkung.

Triaminopyrazol, Sulfat und Wasser sind über ein dreidimensionales Netzwerk von Wasserstoffbrücken miteinander verbunden. Das Pyrazol ist mit insgesamt sieben Wasserstoffbrücken mit Sulfaten verbunden sowie mit zwei weiteren Brücken mit dem Wassermolekülen. Das Wassermolekül ist ebenfalls durch zwei Wasserstoffbrücken mit dem Sulfat verbunden. Die nachfolgenden Nummerierungen der Atome bezieht sich auf Abbildung 10.1.

Tabelle 10.1: Wasserstoffbrücken in Verbindung 66

D-H...O	D-H [Å]	H...O [Å]	D...O [Å]	D-H-O [°]	Symmetrie
N(1)-H(1)...O(5)	0.87(3)	1.93(3)	2.801(2)	177(3)	x,y,z
N(2)-H(2)...O(1)	0.88(3)	1.85(3)	2.737(2)	175(2)	x-1/2,y,-z+3/2
N(3)-H(3A)...O(3)	0.80(2)	2.17(2)	2.940(2)	162(2)	x-1/2,y,-z+3/2
N(3)-H(3B)...O(2)	0.85(3)	2.09(3)	2.887(2)	157(2)	x,-y+1/2,z+1/2
N(4)-H(4A)...O(2)	0.88(2)	1.86(2)	2.741(2)	172(2)	x,-y+1/2,z+1/2
N(4)-H(4B)...O(3)	0.91(3)	1.89(3)	2.779(2)	163(2)	-x+2,y-1/2,-z+3/2
N(4)-H(4C)...O(1)	0.86(3)	2.03(3)	2.822(2)	152(2)	-x+2,y+1/2,-z+3/2
N(5)-H(5A)...O(5)	0.82(3)	2.13(3)	2.931(2)	167(3)	x+1/2,y,-z+3/2
N(5)-H(5B)...O(1)	0.79(3)	2.21(3)	2.932(2)	152(2)	x,y,z
O(5)-H(5C)...O(4)	0.82(3)	1.98(3)	2.723(2)	150(3)	x,y,z
O(5)-H(5D)...O(4)	0.77(3)	1.94(3)	2.703(2)	175(3)	-x+3/2,y-1/2,z

Tabelle 10.2: Bindungslängen der Verbindung 66

Atome	Bindungslänge [Å]	Atome	Bindungslänge [Å]
S-O(4)	1.4655(14)	N(5)-H(5A)	0.82(3)
S-O(3)	1.4721(13)	N(5)-H(5B)	0.79(3)
S-O(2)	1.4785(13)	N(2)-N(1)	1.388(2)
S-O(1)	1.4846(13)	N(2)-H(2)	0.88(3)
N(4)-C(2)	1.449(2)	N(3)-H(3A)	0.80(2)
N(4)-H(4A)	0.88(2)	N(3)-H(3B)	0.84(3)
N(4)-H(4B)	0.91(2)	N(1)-C(3)	1.345(2)
N(4)-H(4C)	0.86(3)	N(1)-H(1)	0.87(3)
C(1)-N(3)	1.340(2)	C(2)-C(3)	1.404(2)
C(1)-N(2)	1.352(2)	O(5)-H(5C)	0.82(3)
C(1)-C(2)	1.390(2)	O(5)-H(5D)	0.76(3)
N(5)-C(3)	1.331(2)	N(5)-H(5A)	0.82(3)

Tabelle 10.3: Bindungswinkel der Verbindung 66

Atome	Bindungswinkel [°]	Atome	Bindungswinkel [°]
O(4)-S-O(3)	110.49(8)	H(5A)-N(5)-H(5B)	116(3)
O(4)-S-O(2)	110.85(8)	C(1)-N(2)-N(1)	108.49(15)
O(3)-S-O(2)	109.36(8)	C(1)-N(2)-H(2)	123.2(17)
O(4)-S-O(1)	108.96(8)	N(1)-N(2)-H(2)	117.8(17)
O(3)-S-O(1)	109.44(8)	C(1)-N(3)-H(3A)	117.5(17)
O(2)-S-O(1)	107.69(8)	C(1)-N(3)-H(3B)	121.6(18)
C(2)-N(4)-H(4A)	112.4(13)	H(3A)-N(3)-H(3B)	120(3)
C(2)-N(4)-H(4B)	114.0(15)	C(3)-N(1)-H(1)	133.9(18)
H(4A)-N(4)-H(4B)	104(2)	N(2)-N(1)-H(1)	114.5(18)
C(2)-N(4)-H(4C)	110.0(16)	C(1)-C(2)-C(3)	107.71(15)
H(4A)-N(4)-H(4C)	108(2)	C(1)-C(2)-N(4)	128.26(15)
H(4B)-N(4)-H(4C)	108(2)	C(3)-C(2)-N(4)	124.02(15)
N(3)-C(1)-N(2)	121.46(17)	N(5)-C(3)-N(1)	124.11(17)
N(3)-C(1)-C(2)	131.11(17)	N(5)-C(3)-C(2)	128.75(17)
N(2)-C(1)-C(2)	107.42(15)	N(1)-C(3)-C(2)	107.13(16)
C(3)-N(5)-H(5A)	118.4(18)	H(5C)-O(5)-H(5D)	102(3)
C(3)-N(5)-H(5B)	122.8(19)	C(3)-N(1)-N(2)	108.86(15)

Tabelle 10.4: Torsionswinkel der Verbindung 66

Atome	Torsionswinkel [°]	Atome	Torsionswinkel [°]
N(3)-C(1)-N(2)-N(1)	-173.55(16)	N(2)-N(1)-C(3)-N(5)	-175.65(18)
C(2)-C(1)-N(2)-N(1)	5.42(19)	N(2)-N(1)-C(3)-C(2)	5.01(19)
C(1)-N(2)-N(1)-C(3)	-6.6(2)	C(1)-C(2)-C(3)-N(5)	179.0(2)
N(3)-C(1)-C(2)-C(3)	176.47(19)	N(4)-C(2)-C(3)-N(5)	-1.9(3)
N(2)-C(1)-C(2)-C(3)	-2.36(19)	C(1)-C(2)-C(3)-N(1)	-1.68(19)
N(3)-C(1)-C(2)-N(4)	-2.5(3)	N(4)-C(2)-C(3)-N(1)	177.37(16)
N(2)-C(1)-C(2)-N(4)	178.64(17)		

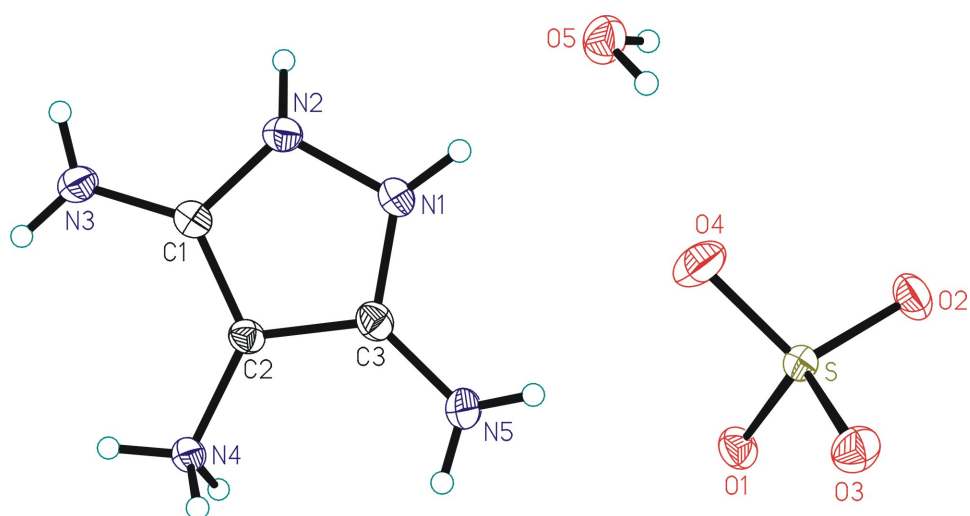


Abbildung 10.1: Kristallstruktur von Triaminopyrazol 66

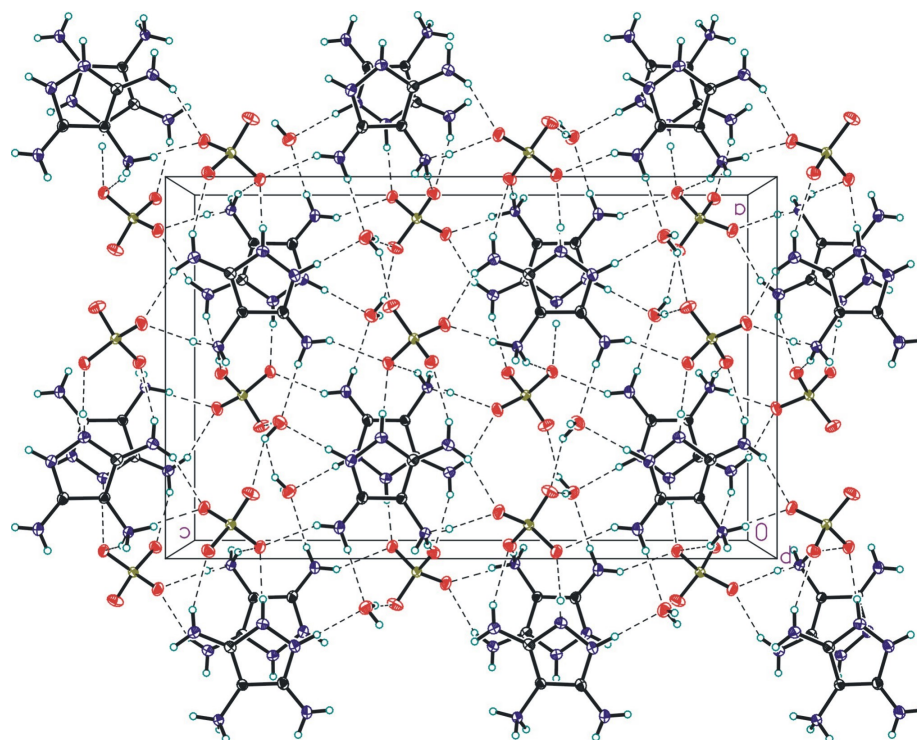


Abbildung 10.2: Elementarzelle von Triaminopyrazol 66

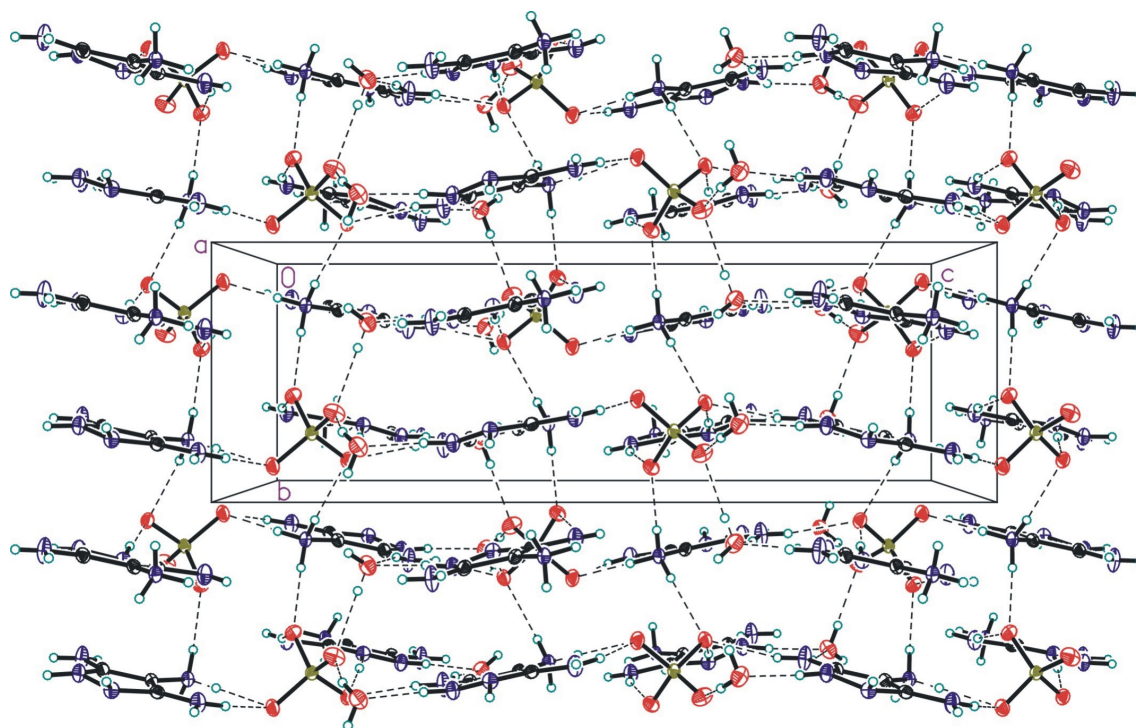


Abbildung 10.3: Seitenansicht der Stapelung von Triaminopyrazol 66

10.2.2 Kristallstruktur von Verbindung 89

Die Verbindung wurde aus EtOAc umkristallisiert. Zur Kristallstrukturbestimmung wurde ein roter, nadelförmiger Kristall mit den Abmessungen 0.03 x 0.07 x 1.25 mm verwendet.

Kristallsystem: orthorhombisch

Raumgruppe: P bca

Elementarzelle: $a = 23.287(4) \text{ \AA}$, $b = 7.1720(9) \text{ \AA}$, $c = 33.031(5) \text{ \AA}$;

$$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$$

Volumen: $5516.6(13) \text{ \AA}^3$

Berechnete Dichte: 1.439 Mg/m^3

Reflexe gemessen: 46156

Der Kristall besteht aus drei voneinander unabhängigen Strukturen, die untereinander sehr ähnlich sind. Abweichungen bestehen nur in geringen Abweichung von deren Planarität. Die Bindungslängen der Hauptkomponente ist denen in 3-Phenylpyrazolo-[4,5-b]-quinoxalin sehr ähnlich¹⁴¹. Die Bindungslängen in der Quinoxalineinheit entspricht denen in Naphtalin. Die Pyrazoloquinoxaliningruppen sind annähernd planar. Die Abweichungen betragen bei Molekül 1 0.020 \AA , bei Molekül 2 0.015 \AA und bei Molekül 3 0.019 \AA . Die Moleküle bilden Stapel in der kristallographischen b-Richtung. Es bilden sich hierbei zwei unterschiedliche Stapel. Einer besteht ausschließlich aus Molekülen der Form 1. Der Winkel benachbarter Ebenen beträgt 6.5° , der kürzeste intermolekulare C-C Abstand beträgt $3.274(6) \text{ \AA}$. Der zweite besteht alternierend aus Molekülen der Form 2 und 3. Hier beträgt der Winkel zwischen benachbarten Ebenen 1.0° und der kürzeste intermolekulare C-C Abstand beträgt $3.389(6) \text{ \AA}$.

Die Ebenen sind über N-H \cdots N Wasserstoffbrücken zu zweidimensionalen Strukturen, parallel zu der 001-Fläche miteinander verbunden. Nur fünf von sechs N-H-Bindungen sind in Wasserstoffbrücken involviert. Die Wasserstoffbindungen sind mit einem N-H-Abstand von $2.11\text{-}2.43 \text{ \AA}$ relativ

schwach. Die N⁸-H⁸-Bindung, die nicht in den Wasserstoffbrückenbindungen involviert ist, zeigt eine schwache N-H⁸... π Interaktion mit zwei der Kohlenstoffe des Benzolmotivs. Diese Interaktion verbindet benachbarte, wasserstoffbrücken gebundene Schichten in der kristallographischen c-Richtung.

Tabelle 10.5: Wasserstoffbrücken der Verbindung **89**

N - H ... N	N-H [Å]	H...N [Å]	N...N [Å]	N-H-N [°]	Symmetrie
N3 - H3A ... N12	0.88	2.19	3.073(5)	176	x-1/2, y, 1/2-z
N3 - H3B ... N15	0.88	2.38	3.172(4)	150	1/2-x, 1/2+y, z
N8 - H8A ... N14	0.88	2.31	3.157(4)	161	3/2-x, y-1/2, z
N13- H13A... N2	0.88	2.43	3.307(5)	172	1/2+x, y, 1/2-z
N13- H13B... N7	0.88	2.11	2.979(4)	169	3/2-x, 1/2+y, z

Tabelle 10.6: Bindungslängen der Verbindung 89

Atome	Bindungslänge [Å]	Atome	Bindungslänge [Å]
N(5)-C(3)	1.320(5)	C(21)-C(22)	1.451(5)
N(5)-C(10)	1.373(5)	N(9)-C(12)	1.319(4)
N(4)-C(2)	1.325(5)	N(9)-C(15)	1.371(5)
N(4)-C(5)	1.371(5)	C(22)-C(23)	1.425(5)
C(2)-C(3)	1.423(5)	N(11)-C(23)	1.351(5)
C(2)-C(1)	1.435(5)	N(11)-C(24)	1.443(4)
C(10)-C(9)	1.413(5)	C(25)-C(26)	1.414(5)
C(10)-C(5)	1.434(5)	C(25)-C(30)	1.434(5)
N(2)-C(1)	1.326(5)	C(13)-N(6)	1.354(5)
N(2)-N(1)	1.411(4)	C(13)-C(12)	1.430(5)
N(1)-C(3)	1.349(4)	C(15)-C(16)	1.427(5)
N(1)-C(4)	1.439(4)	C(15)-C(20)	1.430(5)
C(5)-C(6)	1.417(5)	N(7)-C(11)	1.315(5)
C(6)-C(7)	1.356(5)	N(7)-N(6)	1.398(4)
C(9)-C(8)	1.365(5)	C(29)-C(28)	1.356(5)
C(1)-N(3)	1.357(5)	C(29)-C(30)	1.429(5)
C(7)-C(8)	1.414(5)	N(6)-C(14)	1.446(5)
N(14)-C(22)	1.326(4)	C(12)-C(11)	1.432(5)
N(14)-C(25)	1.366(4)	C(26)-C(27)	1.360(5)
N(15)-C(23)	1.321(4)	C(20)-C(19)	1.408(5)
N(15)-C(30)	1.371(5)	C(16)-C(17)	1.375(5)
N(10)-C(13)	1.323(4)	C(11)-N(8)	1.377(5)
N(10)-C(20)	1.370(5)	C(27)-C(28)	1.408(5)

Atome	Bindungslänge [Å]	Atome	Bindungslänge [Å]
N(12)-C(21)	1.330(5)	C(17)-C(18)	1.416(6)
N(12)-N(11)	1.404(4)	C(18)-C(19)	1.366(6)
N(13)-C(21)	1.355(4)		

Tabelle 10.7: Bindungswinkel der Verbindung 89

Atome	Bindungswinkel [°]	Atome	Bindungswinkel [°]
C(3)-N(5)-C(10)	112.3(3)	C(23)-N(11)-C(24)	128.4(3)
C(2)-N(4)-C(5)	113.7(3)	N(12)-N(11)-C(24)	119.1(3)
N(4)-C(2)-C(3)	122.9(4)	N(14)-C(25)-C(26)	119.7(3)
N(4)-C(2)-C(1)	131.7(4)	N(14)-C(25)-C(30)	121.9(3)
C(3)-C(2)-C(1)	105.4(3)	C(26)-C(25)-C(30)	118.4(3)
N(5)-C(10)-C(9)	118.6(3)	N(10)-C(13)-N(6)	128.2(4)
N(5)-C(10)-C(5)	122.8(3)	N(10)-C(13)-C(12)	125.3(3)
C(9)-C(10)-C(5)	118.7(4)	N(6)-C(13)-C(12)	106.5(3)
C(1)-N(2)-N(1)	106.0(3)	N(9)-C(15)-C(16)	117.4(4)
C(3)-N(1)-N(2)	111.6(3)	N(9)-C(15)-C(20)	123.3(3)
C(3)-N(1)-C(4)	127.3(3)	C(16)-C(15)-C(20)	119.3(4)
N(2)-N(1)-C(4)	120.8(3)	C(11)-N(7)-N(6)	106.8(3)
N(4)-C(5)-C(6)	118.9(3)	C(28)-C(29)-C(30)	120.7(4)
N(4)-C(5)-C(10)	122.5(4)	N(15)-C(23)-N(11)	127.7(3)
C(6)-C(5)-C(10)	118.6(3)	N(11)-C(23)-C(22)	107.3(3)
C(7)-C(6)-C(5)	121.4(4)	C(13)-N(6)-N(7)	111.1(3)
N(5)-C(3)-N(1)	127.9(3)	C(13)-N(6)-C(14)	128.8(3)
N(5)-C(3)-C(2)	125.7(4)	N(7)-N(6)-C(14)	119.8(3)
N(1)-C(3)-C(2)	106.4(3)	N(9)-C(12)-C(13)	123.5(3)

Atome	Bindungswinkel [°]	Atome	Bindungswinkel [°]
C(8)-C(9)-C(10)	120.5(4)	N(9)-C(12)-C(11)	131.8(4)
N(2)-C(1)-N(3)	123.3(3)	C(13)-C(12)-C(11)	104.7(3)
N(2)-C(1)-C(2)	110.6(3)	N(15)-C(30)-C(29)	118.3(3)
N(3)-C(1)-C(2)	126.1(4)	N(15)-C(30)-C(25)	123.1(3)
C(6)-C(7)-C(8)	119.7(4)	C(29)-C(30)-C(25)	118.6(3)
C(9)-C(8)-C(7)	121.0(4)	C(27)-C(26)-C(25)	121.2(4)
C(22)-N(14)-C(25)	114.3(3)	N(10)-C(20)-C(19)	118.6(4)
C(23)-N(15)-C(30)	112.8(3)	N(10)-C(20)-C(15)	122.7(4)
C(13)-N(10)-C(20)	112.3(3)	C(19)-C(20)-C(15)	118.7(4)
C(21)-N(12)-N(11)	106.8(3)	C(17)-C(16)-C(15)	119.8(4)
N(12)-C(21)-N(13)	122.7(3)	N(7)-C(11)-N(8)	121.0(3)
N(12)-C(21)-C(22)	110.1(3)	N(7)-C(11)-C(12)	111.0(3)
N(13)-C(21)-C(22)	127.1(3)	N(8)-C(11)-C(12)	127.9(4)
C(12)-N(9)-C(15)	113.0(3)	C(26)-C(27)-C(28)	120.5(4)
N(14)-C(22)-C(23)	123.0(3)	C(16)-C(17)-C(18)	120.6(4)
N(14)-C(22)-C(21)	132.4(3)	C(19)-C(18)-C(17)	120.3(4)
C(23)-C(22)-C(21)	104.6(3)	C(18)-C(19)-C(20)	121.2(4)
C(23)-N(11)-N(12)	111.1(3)	C(29)-C(28)-C(27)	120.6(4)
N(15)-C(23)-C(22)	124.9(3)		

Tabelle 10.8: Torsionswinkel der Verbindung 89

Atome	Torsionswinkel [°]	Atome	Torsionswinkel [°]
C(5)-N(4)-C(2)-C(3)	-0.5(5)	C(30)-N(15)-C(23)-C(22)	-1.0(5)
C(5)-N(4)-C(2)-C(1)	-179.2(4)	N(12)-N(11)-C(23)-N(15)	-178.2(4)
C(3)-N(5)-C(10)-C(9)	179.8(4)	C(24)-N(11)-C(23)-N(15)	-12.1(7)

Atome	Torsionswinkel [°]	Atome	Torsionswinkel [°]
C(3)-N(5)-C(10)-C(5)	-0.4(5)	N(12)-N(11)-C(23)-C(22)	2.0(4)
C(1)-N(2)-N(1)-C(3)	1.7(4)	C(24)-N(11)-C(23)-C(22)	168.1(4)
C(1)-N(2)-N(1)-C(4)	175.6(3)	N(14)-C(22)-C(23)-N(15)	0.7(6)
C(2)-N(4)-C(5)-C(6)	178.1(4)	C(21)-C(22)-C(23)-N(15)	179.3(4)
C(2)-N(4)-C(5)-C(10)	-0.9(5)	N(14)-C(22)-C(23)-N(11)	-179.5(3)
N(5)-C(10)-C(5)-N(4)	1.4(6)	C(21)-C(22)-C(23)-N(11)	-0.9(4)
C(9)-C(10)-C(5)-N(4)	-178.7(4)	N(10)-C(13)-N(6)-N(7)	-179.3(4)
N(5)-C(10)-C(5)-C(6)	-177.5(3)	C(12)-C(13)-N(6)-N(7)	-0.4(4)
C(9)-C(10)-C(5)-C(6)	2.3(6)	N(10)-C(13)-N(6)-C(14)	6.8(7)
N(4)-C(5)-C(6)-C(7)	179.6(4)	C(12)-C(13)-N(6)-C(14)	-174.3(4)
C(10)-C(5)-C(6)-C(7)	-1.4(6)	C(11)-N(7)-N(6)-C(13)	0.3(4)
C(10)-N(5)-C(3)-N(1)	178.3(4)	C(11)-N(7)-N(6)-C(14)	174.8(4)
C(10)-N(5)-C(3)-C(2)	-1.0(6)	C(15)-N(9)-C(12)-C(13)	-0.7(5)
N(2)-N(1)-C(3)-N(5)	178.8(4)	C(15)-N(9)-C(12)-C(11)	-178.8(4)
C(4)-N(1)-C(3)-N(5)	5.3(7)	N(10)-C(13)-C(12)-N(9)	0.8(6)
N(2)-N(1)-C(3)-C(2)	-1.8(4)	N(6)-C(13)-C(12)-N(9)	-178.2(4)
C(4)-N(1)-C(3)-C(2)	-175.2(4)	N(10)-C(13)-C(12)-C(11)	179.3(4)
N(4)-C(2)-C(3)-N(5)	1.6(6)	N(6)-C(13)-C(12)-C(11)	0.4(4)
C(1)-C(2)-C(3)-N(5)	-179.4(4)	C(23)-N(15)-C(30)-C(29)	-178.1(3)
N(4)-C(2)-C(3)-N(1)	-177.9(4)	C(23)-N(15)-C(30)-C(25)	0.1(5)
C(1)-C(2)-C(3)-N(1)	1.2(4)	C(28)-C(29)-C(30)-N(15)	179.2(4)
N(5)-C(10)-C(9)-C(8)	178.8(4)	C(28)-C(29)-C(30)-C(25)	0.9(6)
C(5)-C(10)-C(9)-C(8)	-1.1(6)	N(14)-C(25)-C(30)-N(15)	1.2(6)
N(1)-N(2)-C(1)-N(3)	178.6(4)	C(26)-C(25)-C(30)-N(15)	-179.3(4)
N(1)-N(2)-C(1)-C(2)	-0.9(4)	N(14)-C(25)-C(30)-C(29)	179.4(3)
N(4)-C(2)-C(1)-N(2)	178.7(4)	C(26)-C(25)-C(30)-C(29)	-1.1(5)

Atome	Torsionswinkel [°]	Atome	Torsionswinkel [°]
C(3)-C(2)-C(1)-N(2)	-0.2(5)	N(14)-C(25)-C(26)-C(27)	-179.7(4)
N(4)-C(2)-C(1)-N(3)	-0.7(7)	C(30)-C(25)-C(26)-C(27)	0.8(6)
C(3)-C(2)-C(1)-N(3)	-179.6(4)	C(13)-N(10)-C(20)-C(19)	-178.8(4)
C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	-0.8(6)	C(13)-N(10)-C(20)-C(15)	0.1(5)
C(10)-C(9)-C(8)-C(7)	-1.1(6)	N(9)-C(15)-C(20)-N(10)	-0.1(6)
C(6)-C(7)-C(8)-C(9)	2.1(6)	C(16)-C(15)-C(20)-N(10)	-179.2(4)
N(11)-N(12)-C(21)-N(13)	-176.8(4)	N(9)-C(15)-C(20)-C(19)	178.8(4)
N(11)-N(12)-C(21)-C(22)	1.7(4)	C(16)-C(15)-C(20)-C(19)	-0.3(6)
C(25)-N(14)-C(22)-C(23)	0.6(5)	N(9)-C(15)-C(16)-C(17)	-178.9(4)
C(25)-N(14)-C(22)-C(21)	-177.6(4)	C(20)-C(15)-C(16)-C(17)	0.2(6)
N(12)-C(21)-C(22)-N(14)	177.9(4)	N(6)-N(7)-C(11)-N(8)	176.0(4)
N(13)-C(21)-C(22)-N(14)	-3.7(7)	N(6)-N(7)-C(11)-C(12)	0.0(4)
N(12)-C(21)-C(22)-C(23)	-0.6(4)	N(9)-C(12)-C(11)-N(7)	178.1(4)
N(13)-C(21)-C(22)-C(23)	177.8(4)	C(13)-C(12)-C(11)-N(7)	-0.2(5)
C(21)-N(12)-N(11)-C(23)	-2.3(4)	N(9)-C(12)-C(11)-N(8)	2.4(7)
C(21)-N(12)-N(11)-C(24)	-170.0(3)	C(13)-C(12)-C(11)-N(8)	-175.9(4)
C(22)-N(14)-C(25)-C(26)	179.0(3)	C(15)-C(16)-C(17)-C(18)	0.0(6)
C(22)-N(14)-C(25)-C(30)	-1.5(5)	C(16)-C(17)-C(18)-C(19)	-0.1(6)
C(20)-N(10)-C(13)-N(6)	178.3(4)	C(17)-C(18)-C(19)-C(20)	0.1(6)
C(20)-N(10)-C(13)-C(12)	-0.4(6)	N(10)-C(20)-C(19)-C(18)	179.1(4)
C(12)-N(9)-C(15)-C(16)	179.5(3)	C(15)-C(20)-C(19)-C(18)	0.1(6)
C(12)-N(9)-C(15)-C(20)	0.4(5)	C(30)-C(29)-C(28)-C(27)	-0.3(6)
C(25)-C(26)-C(27)-C(28)	-0.2(6)	C(26)-C(27)-C(28)-C(29)	0.0(6)
C(30)-N(15)-C(23)-N(11)	179.2(4)		

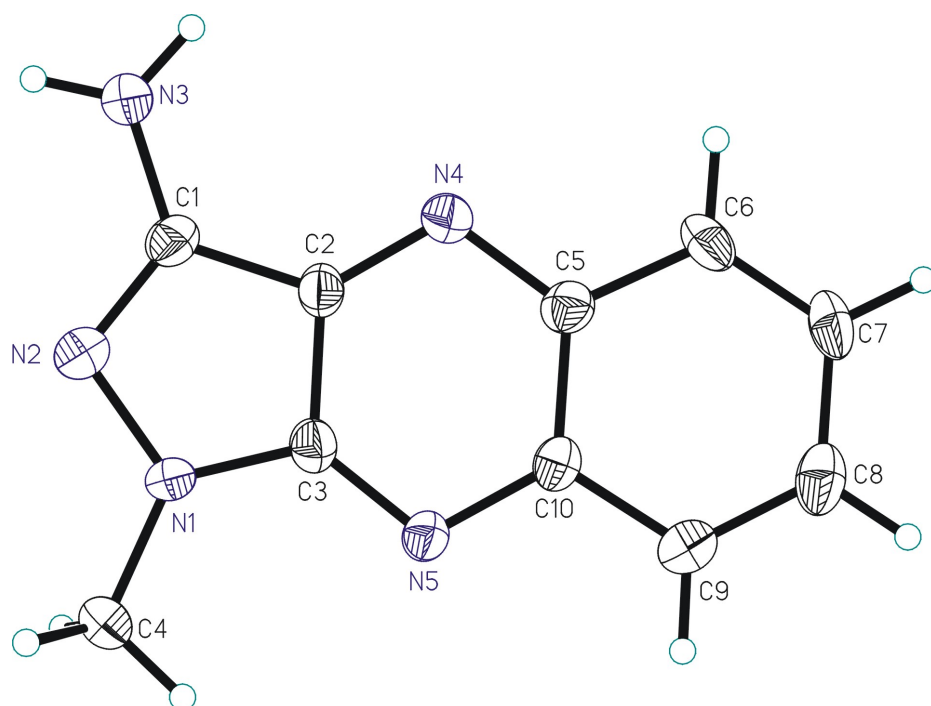


Abbildung 10.4: Kristallstruktur von Verbindung **89** (Molekül 1)

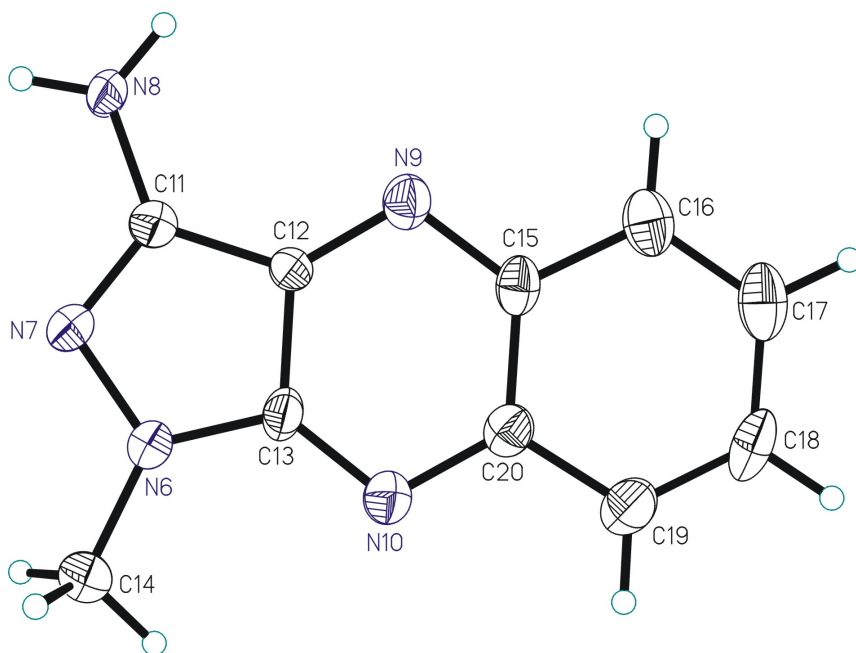


Abbildung 10.5: Kristallstruktur von Verbindung **89** (Molekül 2)

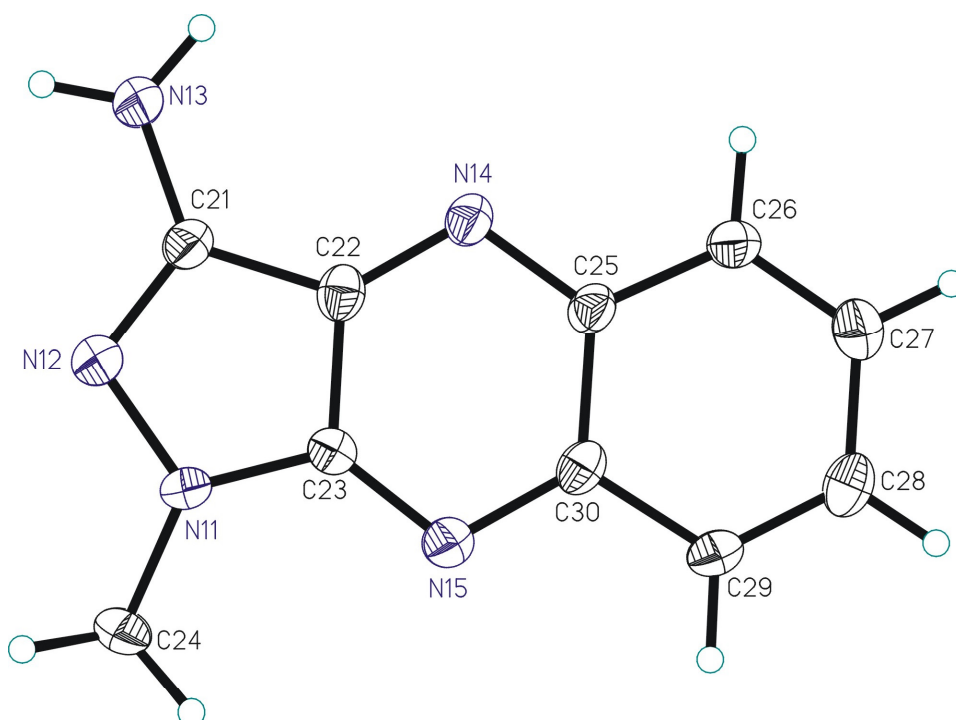


Abbildung 10.6: Kristallstruktur von Verbindung **89** (Molekül 3)

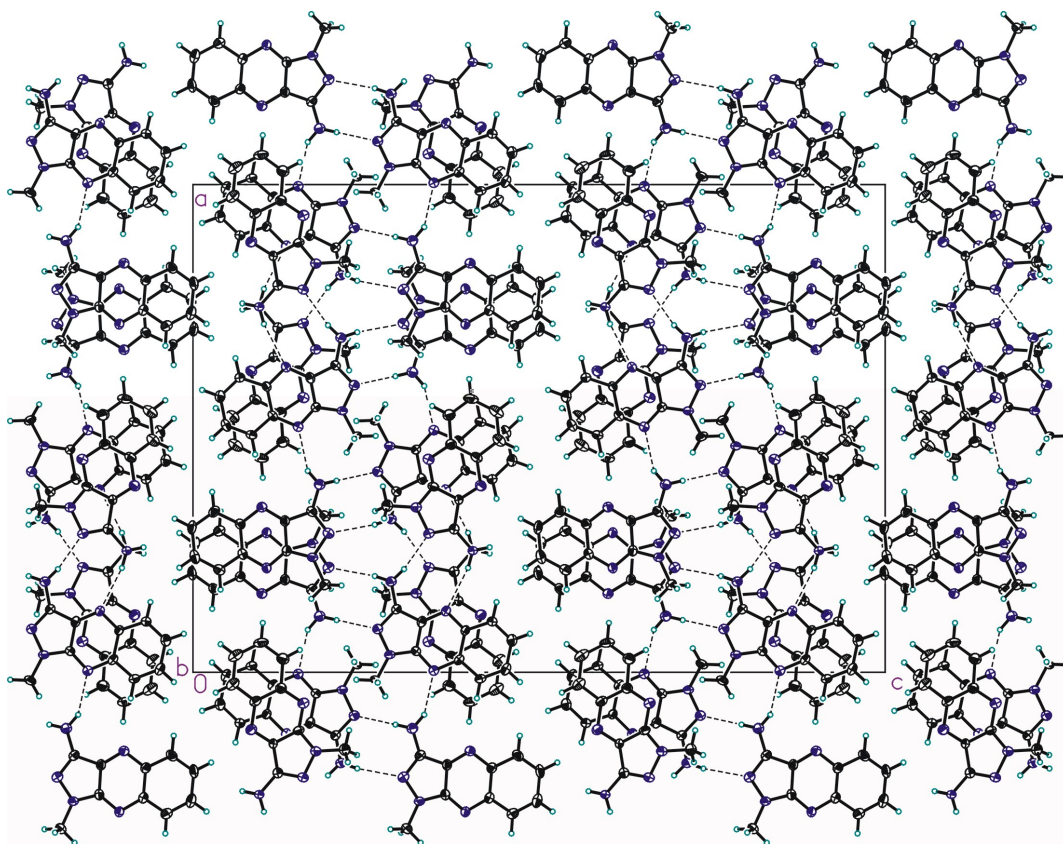


Abbildung 10.7: Kristallstruktur der Elementarzelle von Verbindung **89**

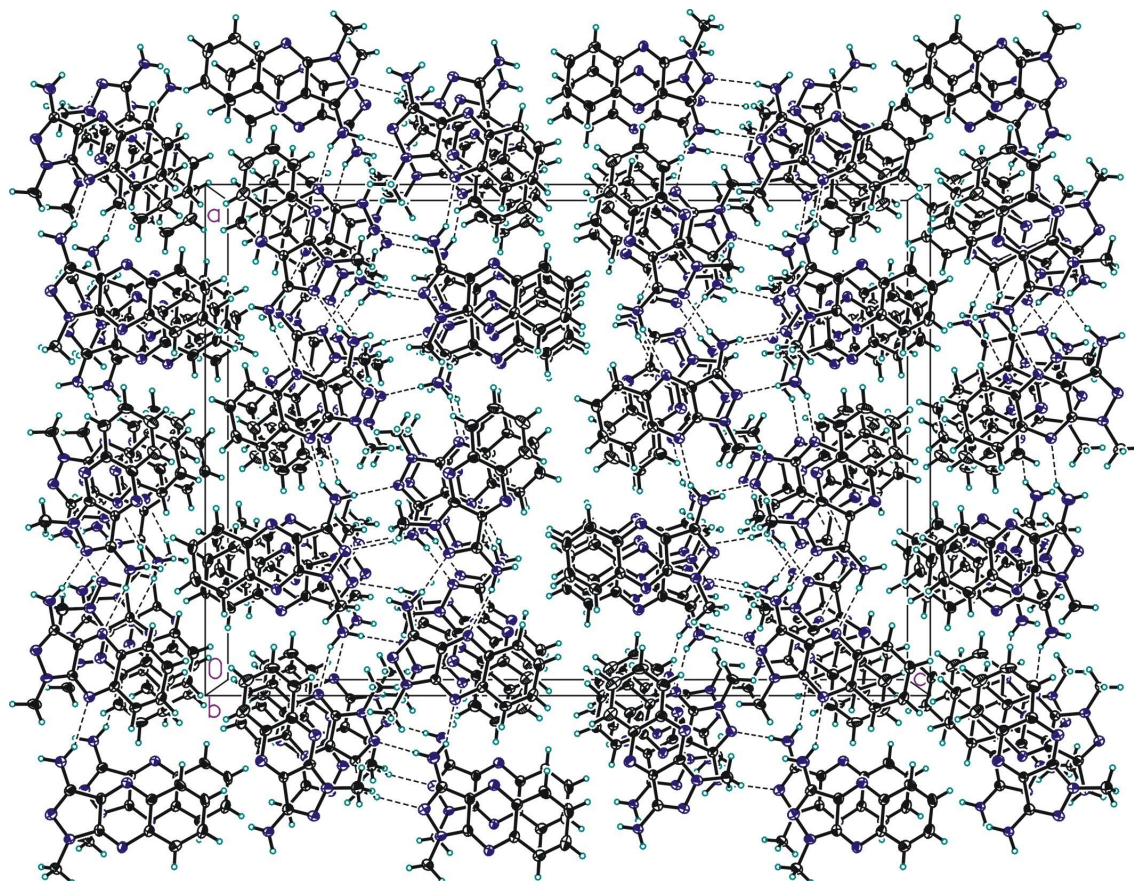


Abbildung 10.8: Aufsicht auf die Kristallstruktur von Verbindung 89

10.3 Synthese der Tripeptidsequenzen

Zur Synthese der Tripeptid-Sequenzen wurden folgende Reagenzien benötigt:

Kaisertest-Lösungen: Lösung I) 80 g Phenol auf 20 ml Ethanol Lösung II) 5 g Ninhydrin auf 100 ml Ethanol Lösung III) 2 ml 0.001 M wässrige KCN-Lösung auf 98 ml Pyridin;

Dimethylformamid

N-Methylpyrrolidin

Fmoc-Abspaltreagenz: Piperidin/DMF = 25 %ig

Materialien:

Filter: CELLPORE Filterplatte, Porengröße 40-100 μM , XS-49040 PE, Esters Filtertechnik, Produktions- und Vertriebsgesellschaft

Harz: Amino PEGA Harz, vorgequollen in Methanol, Novabiochem, 01-64-0100, A 25151, 50-100 mesh (H_2O), Beladung nach Herstellerangaben

10.4 Herstellung der Tripeptidsequenzen

Zur Herstellung der drei Sequenzen (Arg-Arg-Arg, Lys-(D)Lys-Asn (Still-Rana-Peptid), His-Phe-His) wurde Amino-PEGA Harz verwendet (Novabiochem, Kapazität Harz: 0.4 mmol/g, 01-64-0100, A 25151).

Als Bausteine wurden 6 verschiedene Aminosäuren eingesetzt:

Fmoc-D-Lys(Boc)OH, Fmoc-L-Lys(Boc)OH, Fmoc-D-Arg(Pmc), Fmoc-D-PheOH, Fmoc-D-His(Trt)OH, Fmoc-L-Asn(Trt)OH. Die Festphasensynthese wurde in Spritzen durchgeführt, die zuvor mit einem Filtereinsatz versehen wurden. Nach dem Trocknen des PEGA Harzes im Vakuum über 5 h wurden pro Spritze (3 insgesamt, Volumen 2 ml) 40 mg getrocknetes PEGA Harz (0.016 mmol) eingewogen und das Harz wie folgt auf dem Schüttler vorbehandelt:

2 x 5 min mit CH_2Cl_2

2 x 5 min DMF

1 x 15 min Abspaltreagenz Piperidin/DMF (25%ig)

1 x 10 min Abspaltreagenz Piperidin/DMF (25%ig)

5 x Spülen mit DMF

Anschließend erfolgte jeweils die Kupplung der ersten Aminosäureposition. Für die Aminosäuren wurden pro Kupplungsschritt 2 eq eingesetzt. Die Durchführung ist exemplarisch anhand der Kupplung von D-Lys beschrieben:

15 mg Fmoc-D-Lys(Boc)OH (2eq) und 10 mg HOBt (4 eq) wurden in einem Eppendorfcap eingewogen, mit 1 ml DMF versetzt, gründlich gevortext und gegebenenfalls im Ultraschallbad in Lösung gebracht. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl DIC. Nach erneutem Vortexen wurde die Lösung mit der ersten Spritze aufgezogen. Das Harz wurde für 2.5 h mit der Kupplungs-Lösung behandelt, mit DMF gewaschen (fünfmal) und danach einem Kaisertest unterzogen. Im Falle eines positiven Tests wurde die Kupplung für eine weitere Stunde wiederholt. Bei negativem Kaisertest wurde die Kupplung des Reportermoleküls vorbereitet. Hierzu erfolgte zunächst die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mittels Piperidin/DMF analog der oben beschriebenen Vorgehensweise. Zur Kontrolle wurde an dieser Stelle ein Kaisertest durchgeführt der hierbei positiv ausfallen muss. Nach gründlichem Spülen mit DMF wurde das Harz mit einem Tag versehen um die Sequenz zu kodieren. Es wurden 0.15 mg Tag (entspricht 2 % Beladung) in einem Eppendorfcap eingewogen, mit 0.5 ml DMF versetzt und gevortext. Um eine möglichst gleichmäßige Verteilung des Tags auf dem Harz zu gewährleisten, wurde das HOBt (0.5 mg, 10 eq) separat eingewogen, mit 0.5 ml DMF und 0.5 µl DIC versetzt und gevortext. Zunächst wurde die Taglösung mit der Spritze aufgezogen, gut durchmischt und anschließend mit der HOBt/DIC-Lösung versetzt. Zur Überprüfung einer vollständigen Tagung wurde das Harz nach 15 h ausgiebig mit DMF (fünfmal) gewaschen, gefolgt von Methanol (HPLC-rein), um Störsignale bei der folgenden GC-Messung zu vermeiden. Hierzu wurden unter dem Stereomikroskop (Zeiss Stemi 2000-C mit Filter FI S 09 1025-557 HQ 500LP) drei einzelne Harzkugeln separiert und jeweils mit einer Präpariernadel in ein GC-Probenröhrchen (Rotilabo Einsätze, 100 µl, Roth C516.1) überführt. Nach Zugabe von 10 µl MeOH (HPLC-rein) wurde das Röhrchen mit einer Kappe verschlossen und 4 h einer Bestrahlung von 366 nm ausgesetzt. Der freigesetzte Alkohol wurde anschließend am GC unter folgenden Bedingungen vermessen:

GC-Bedingungen:

Typ: HP 6890 Series Gas Chromatograph / μ -ECD mit Chemstation

Trennsäule: : HP 19091Z-433, 325 °C Max, Größe: 30 m x 250 μ m x 0.25 μ m

Trärgas: Helium, constant flow 1.4 ml/min, Druck: 23.34 psi

Injektor: EPC split-splitless Inlet;

Mode: splitless

Heater: 315°C

Pressure: 23.33 psi

Total flow: 70.00 ml/min

Splitless vent: 66.0 ml/min, 0.00 min

Gas saver: 20.0 ml/min, 2.00 min

Detektor: μ ECD Detector

Temperatur: 315 °C

Makeup Flow N₂: 58.6 ml/min

Constant col + makeup: 60.0 ml/min

Temperaturprogramm:

Setpoint: 180°C

Maximum 325 °C, Equilibration: 1.00 min

Oven ramp	°C min	Next °C	Hold (min)	Runtime
Initial		180	1.00	1.00
Ramp1	10.00	310	5.00	19.00
Ramp2	0.00			
Postrun		180	0.00	19.00

Injektionsvolumen: 5 μ l

10.4.1 Acetylierung des polymeren Trägers

250 mg des getrockneten Trägers wurden in einer Spritze mit Filter eingewogen und 10 Minuten mit CH_2Cl_2 (2 ml) vorgequollen. Die Acetylierung wurde mit 2 ml Acetylierungsreagenz ($\text{Ac}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 20:80 + 10 \text{ mg DMAP}/100 \text{ ml}$) durchgeführt. Nach 4 h Schütteln wurde ein Kaisertest durchgeführt und gegebenenfalls, nochmals mit 2 ml Acetylierungsreagenz versetzt. Nach Waschen des Harzes mit DMF (fünfmal), gefolgt von CH_2Cl_2 (dreimal), wurde der acetylierte Träger 5 h getrocknet.

10.4.2 Abspaltung der Schutzgruppen

Das getrocknete Harz wurde in einer Spritze mit Filter eingewogen und mit einer Lösung von 2 ml Abspaltreagenz (1.55 ml TFA, 0.1 ml TIS, 0.05 EDT, 0.1 Thioanisol, 0.1 Wasser, 0.1 Phenol) versetzt. Die Spritzen wurden 24 h damit behandelt. Die Lösung wurde anschließend separiert und das Harz nochmals für 30 Minuten mit 2 ml Abspaltreagenz versetzt. Nach ausgiebigem Waschen des Harzes mit CH_2Cl_2 und Methanol bis zur Geruchsneutralität, wurde abschließend nochmals mit CH_2Cl_2 und Et_2O gewaschen. Die Tripeptide wurden im Vakuum getrocknet und anschließend bei 4°C gelagert.

10.4.3 Inkubation der Tripeptide mit fluoreszenzmarkierter TAR-RNA

Zur Inkubation wurde die TAR_{wt}-RNA (Biospring) eingesetzt. 1 mg Harz (4 μmol , jeweils 0.33 mg einer Sequenz) und 9 mg acetyliertes Harz wurden in einem Eppendorfcap (DEPC-behandelt) mit 150 μl TK-Puffer x1 (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 20 mM KCl, 0.01% Triton X-100) versetzt und gequollen (5 min). Nach Abzentrifugieren wurde der Überstand entnommen und der Vorgang, nach Zusatz von jeweils 100 μl TK-Puffer x1, zweimal wiederholt. Zum Harz wurden anschließend nochmals 60 μl TK-Puffer x1 gegeben, gefolgt von 0.571 nmol TAR_{wt}-RNA// (Verhältnis Tripeptid:RNA = 700:1). Nach gründlichem

vortexen wurde das Harz nochmals zentrifugiert und unter Lichtausschluß (Aluminiumfolie) über Nacht (14 h) leicht geschüttelt. Nach der Inkubation wurde das Harz zunächst mit TK-Puffer x1 gewaschen (dreimal), mit einer Pasteurpipette auf einen Objektträger großflächig aufgetragen und mit der Heißluftpistole auf Kaltstufe getrocknet. Unter dem Stereomikroskop wurden die hell leuchtenden Kugeln mit einer Präparationsnadel isoliert und jeweils in ein GC-Probenröhrchen überführt. Die einzelnen Harzkugeln wurden anschließend mit 10 µl MeOH (HPLC) versetzt, das Probenröhrchen mit einer Kappe verschlossen und für 4 Stunden unter der UV-Lampe (366 nm) bestrahlt. Die Retention des freigesetzten Alkohols wurde mit dem Gaschromatographen detektiert.

10.5 FRET-Messungen

10.5.1 Herstellung der HIV-1 wtTAR¹⁴²

Zur *in vitro* Transkription von HIV-1 TAR^{wt}-RNA wurden 30 µl DEPC Wasser, 30 µl rNTPmix (25 mM/NTP), 20 µl T7 Transkriptionspuffer 5x und 10 µl T7/TAR^{wt}-Templat-DNA in ein DEPC behandeltes Eppendorfcap pipettiert, gevortext und anschließend abzentrifugiert. Nach Zugabe von 10 µl T7 Polymerase Enzym Mix wurde für 4 h bei 37 °C inkubiert. Zur Entfernung des DNA-Templates wurde das Gemisch zunächst für 5 min bei 90 °C erhitzt, anschließend auf Eis abgekühlt, mit 10 µl DNase Puffer x10 und 20 µl DNase (1U/µl) versetzt und nochmals für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Abtrennung der Enzyme wurde mittels Phenol-Extraktion durchgeführt. Hierzu wurde mit 130 µl einer Lösung von Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1, Puffer gesättigte Lösung, 10 mM TrisHCl, pH 8) extrahiert, der Überstand entnommen und das Reaktionsgemisch erneut mit 50 µl DEPC Wasser extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden anschließend mit 170 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1, Puffer gesättigte Lösung, 10 mM TrisHCl, pH 8) extrahiert. Der wäßrige Überstand wurde entnommen und mit 17 µl (1/10

Volumen) Acetat-Puffer (3M NaOAc, pH 5.2 mit HAc) und 510 µl (3 Volumen) absolutem Ethanol versetzt. Der weiß anfallende Niederschlag wurde im Eisfach (-25 °C) komplettiert. Die RNA wurde anschließend 30 min abzentrifugiert und das Pellet nach Entfernen des Überstandes nochmals mit Ethanol gewaschen. Nach Entnahme des Überstands wurde die TAR-RNA in 1 ml DEPC Wasser gelöst und mittels einer NAPTM10 Säule (Pharmacia Biotech, Sephadex G-25 M) entsalzt und gleichzeitig überschüssige NTPs abgetrennt. Die TAR^{wf}-RNA wurde in der Speedvac getrocknet, in insgesamt 100 µl DEPC Wasser aufgenommen und der Gehalt an RNA abschließend UV-spektrometrisch bestimmt (260 nm)

10.5.2 Experimentelle Bedingungen

Gerät: Fluostar (BMG Labtechnologies)

Mikrotiterplatte: Corning 3650, non-binding surface, black

Verstärkungsfaktor (Gain): 87-90%

Absorption: 544 nm; Emission: 590 nm

Temperatur: 37 °C

Schütteln der Mikrotiterplatte: orbital vor jeder Messung

Meßwert: Die Messwerte wurden als Mittelwert von 5 kurz hintereinander aufgenommenen Messungen ausgegeben

Zur FRET-Messung wurden zuerst in einer Mikrotiterplatte 10 µl tat-Peptid, 10 µl TK-Puffer sowie 70 µl DEPC Wasser in ein Well gegeben. In ein zweites Well wurden 10 µl tat-Peptid, 10 µl ^{wf}TAR, 10 µl TK-Puffer sowie 60 µl DEPC Wasser gegeben. Die Konzentration an Peptid und RNA lagen dabei jeweils bei 100 nM. Daraufhin wurde der Verstärkungsfaktor der Fluoreszenz gemessen. Anschließend gab man in die nächsten Wells jeweils 10 µl tat-Peptid, 10 µl ^{wf}TAR, 10 µl TK-Puffer und verschiedene Konzentrationen des jeweiligen Liganden, gelöst in DEPC Wasser. Abschließend wurden die Wells ebenfalls

mit DEPC Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 μl gebracht. Die Messungen wurden alle innerhalb von 5 min nach erfolgter Zugabe durchgeführt. Alle Bestimmungen der IC_{50} -Werte wurden mindestens zweimal wiederholt.

10.5.3 Graphische Darstellung der FRET-Messungen

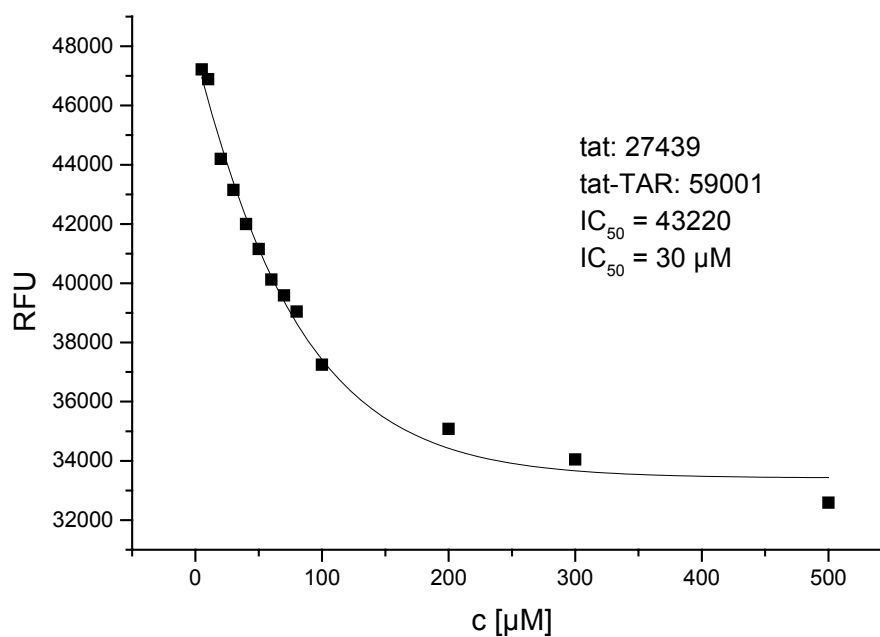


Abbildung 10.9: FRET-Kurve von Triaminopyrazol 66

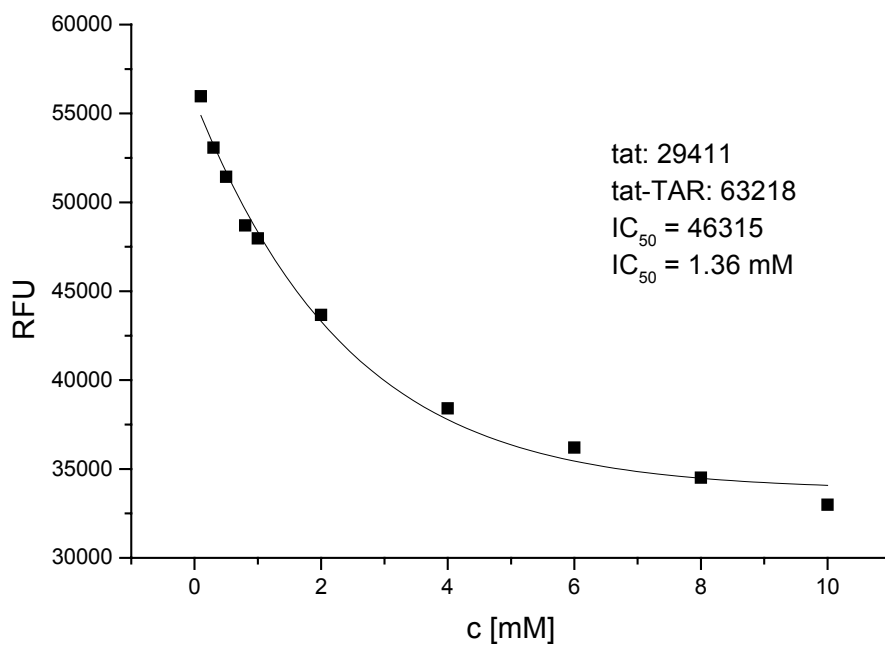


Abbildung 10.10: FRET-Kurve von Triaminopyrazol **66** mit HIV 2

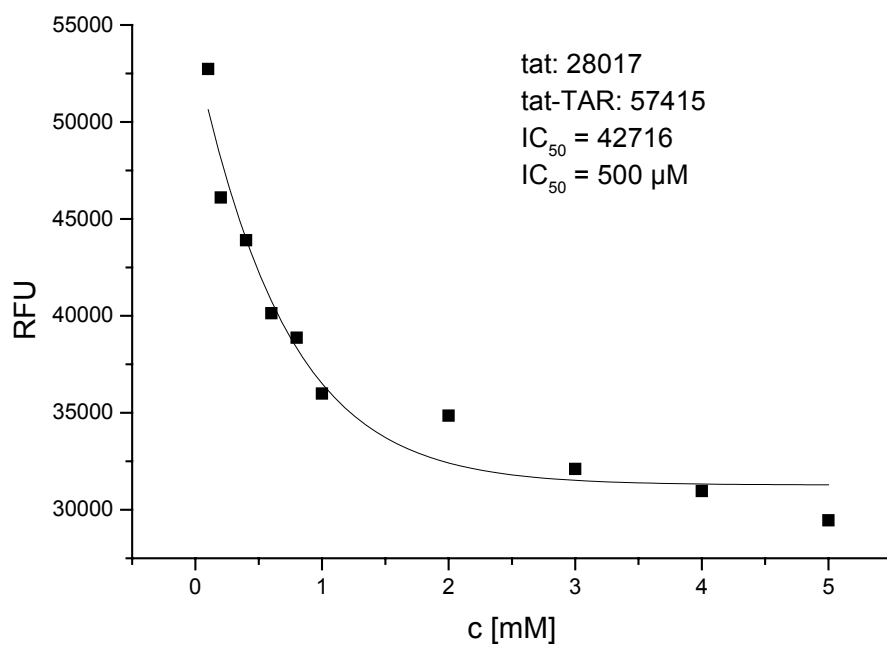


Abbildung 10.11: FRET-Kurve von **79a**

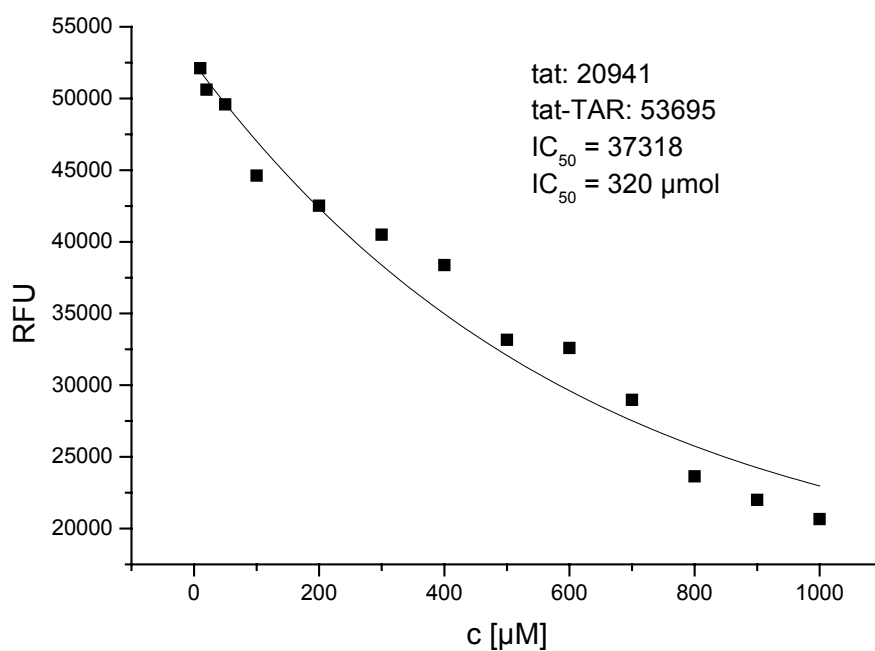


Abbildung 10.12: FRET-Kurve des Oxidationsproduktes von 66

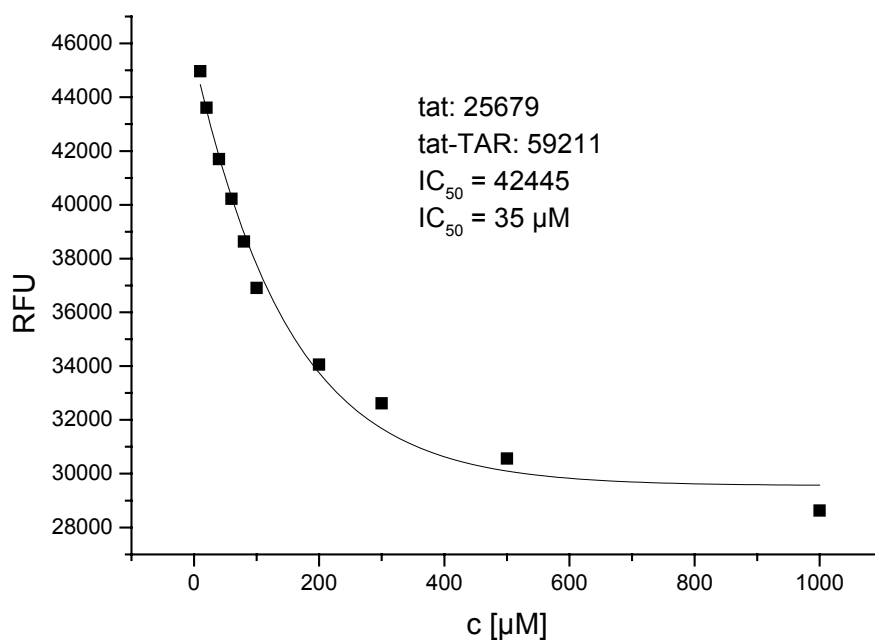
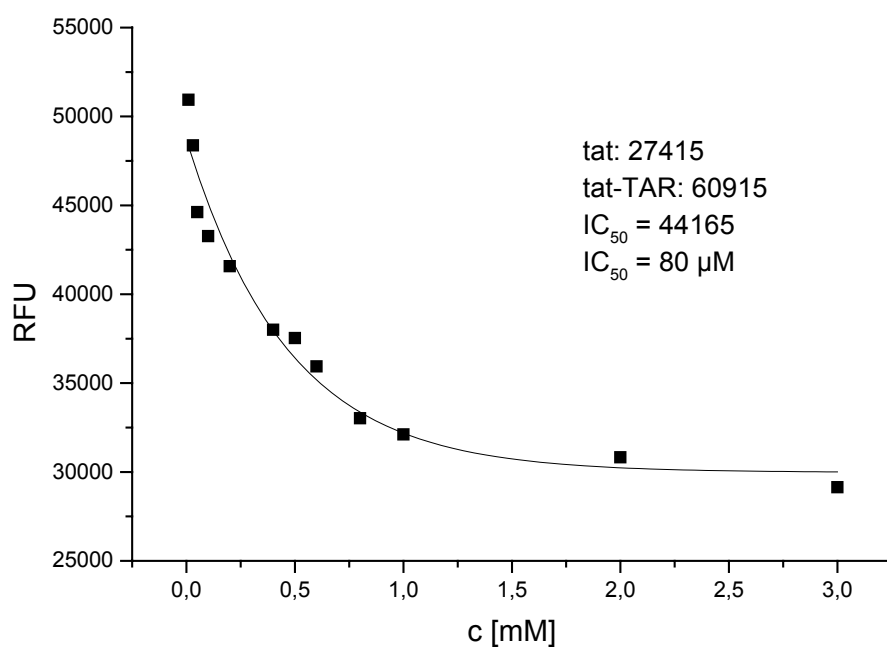
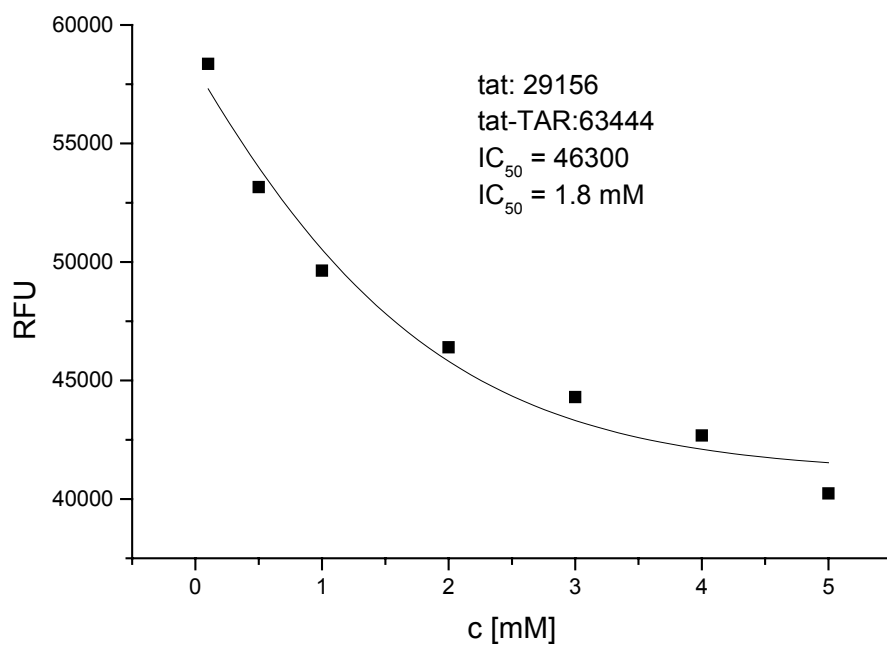
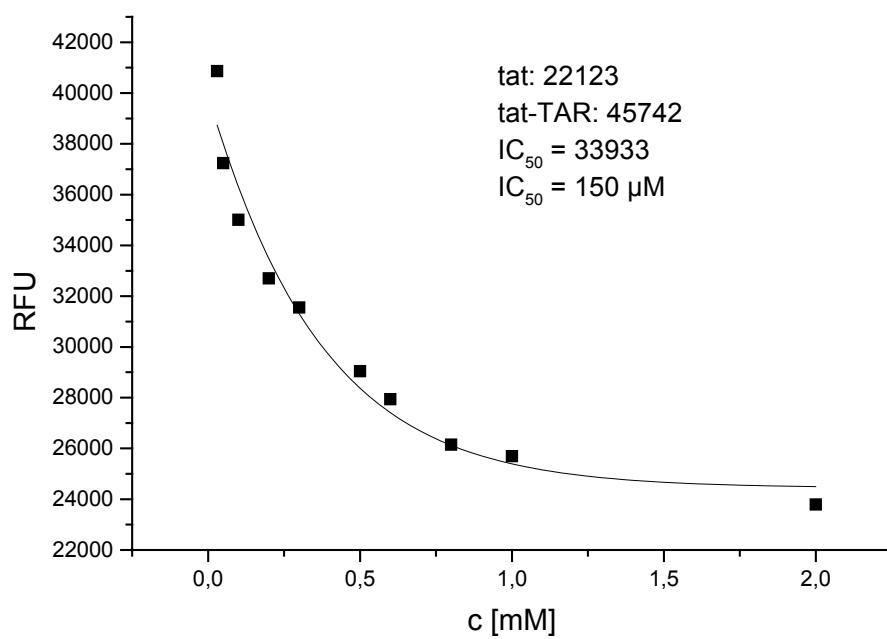
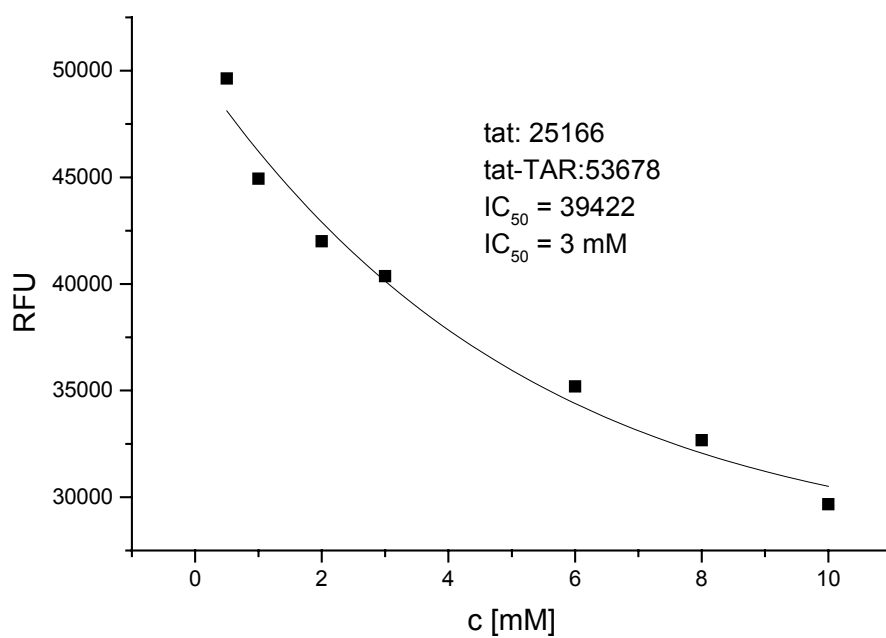
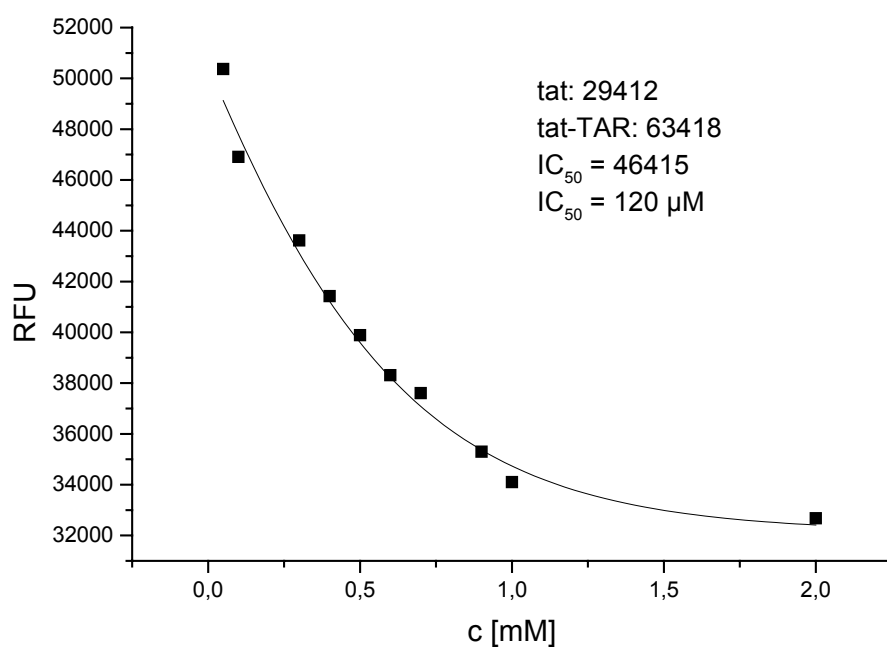
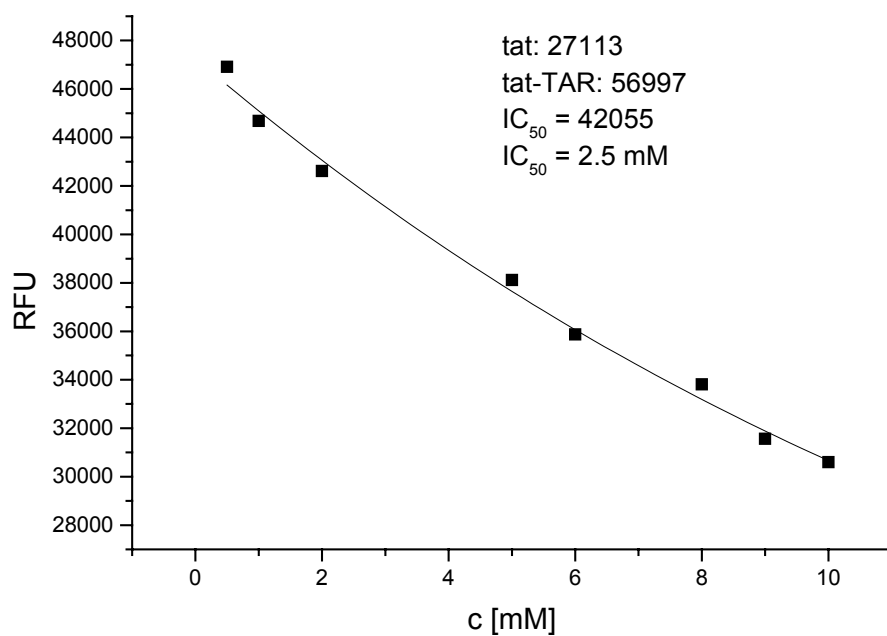


Abbildung 10.13: FRET-Kurve von 66 nach 7 d bei pH 7.4

Abbildung 10.14: FRET-Kurve von **80c**Abbildung 10.15: FRET-Kurve von **79d**

Abbildung 10.16: FRET-Kurve von **80b**Abbildung 10.17: FRET-Kurve von **79c**

Abbildung 10.18: FRET-Kurve von **80a**Abbildung 10.19: FRET-Kurve von **79b**

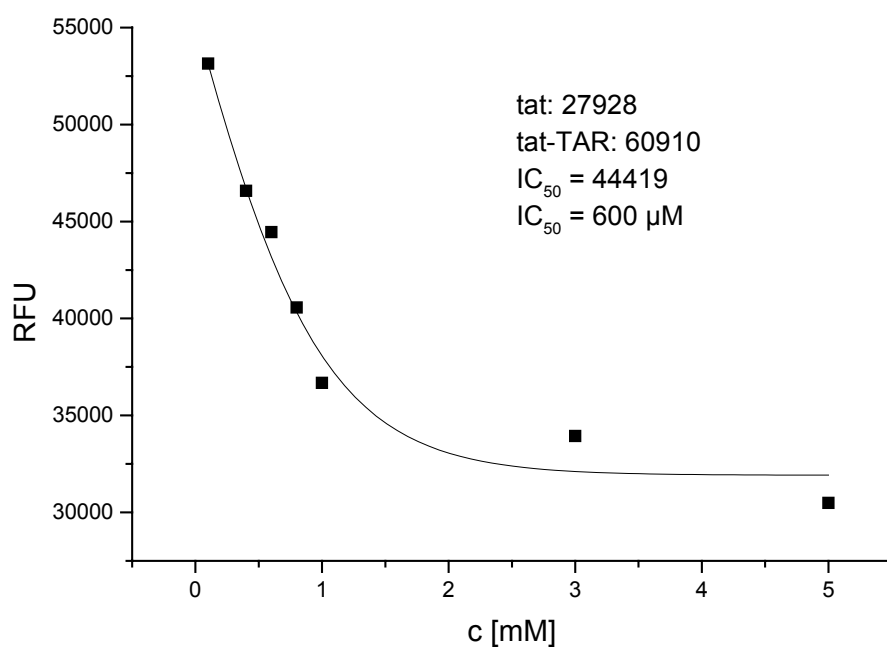


Abbildung 10.20: FRET-Kurve von **89** (oxidiert)

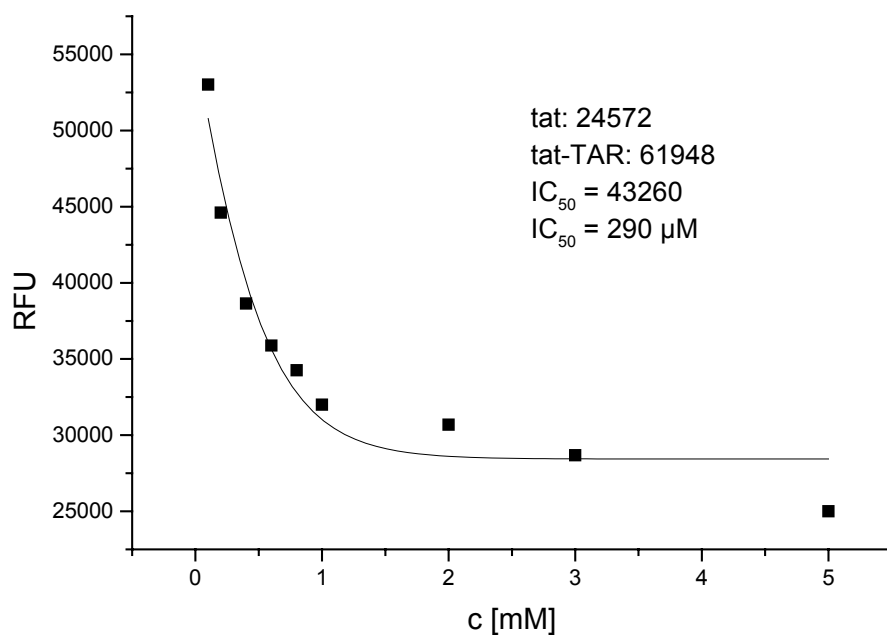
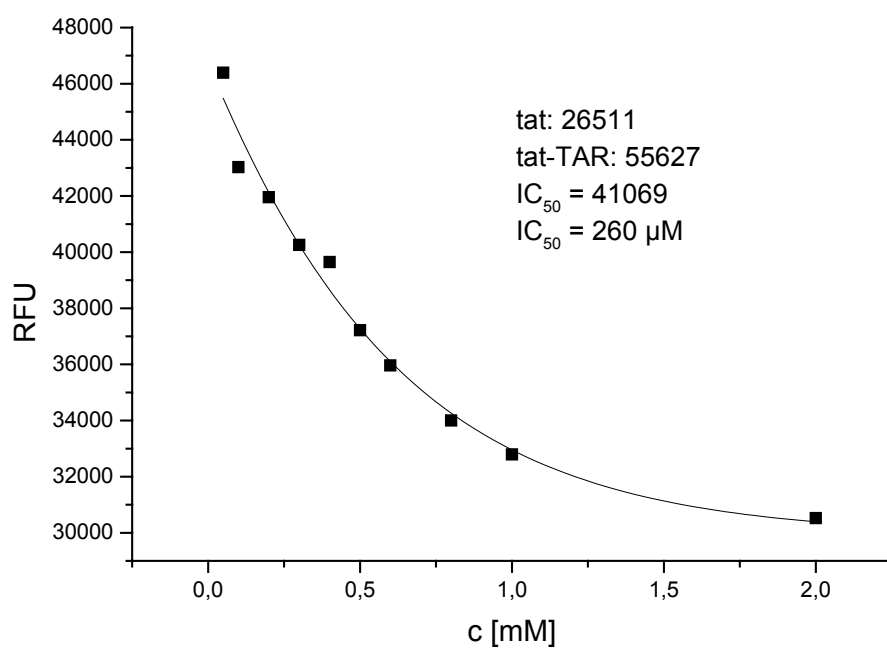
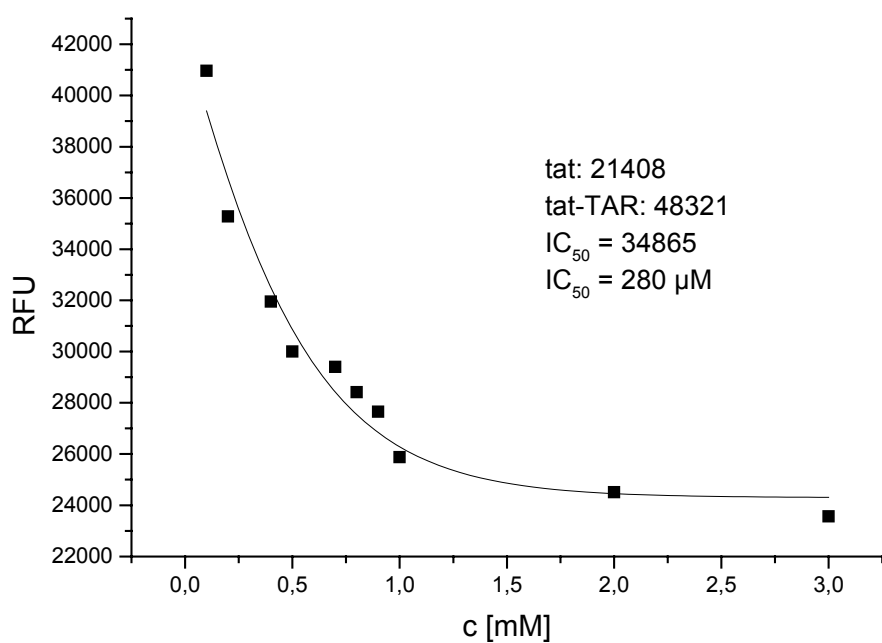
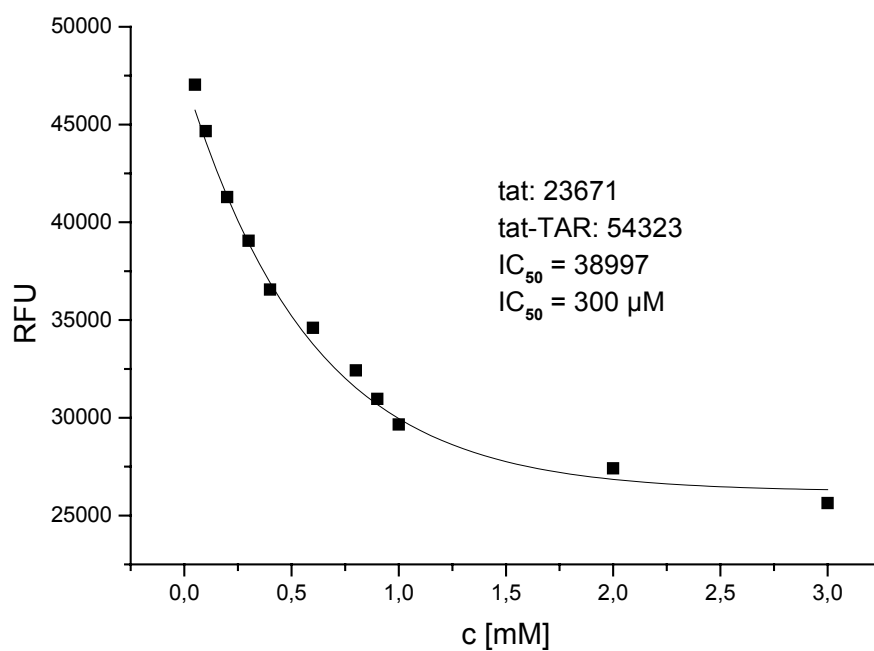
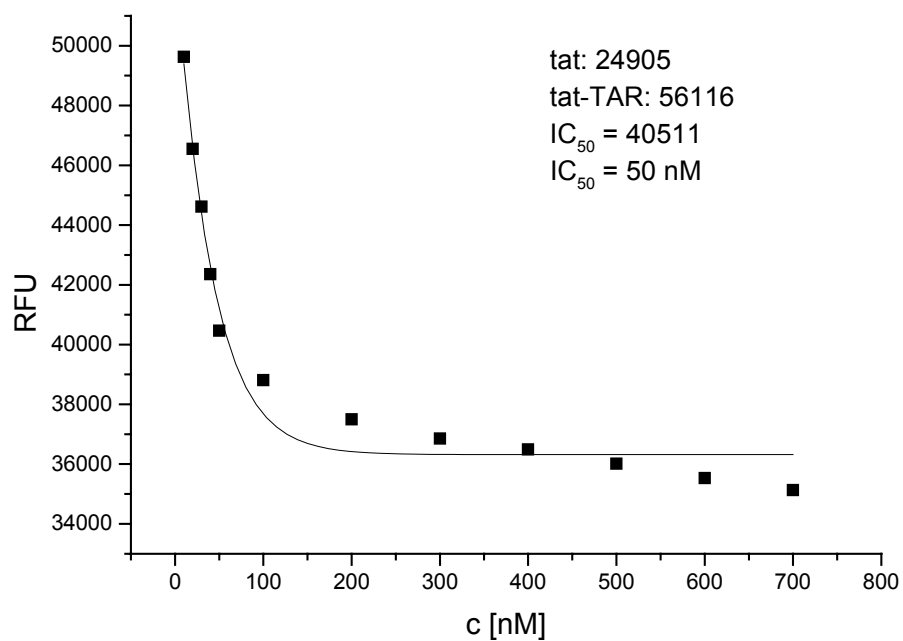


Abbildung 10.21: FRET-Kurve von **89** (reduziert)

Abbildung 10.22: FRET-Kurve von **104**Abbildung 10.23: FRET-Kurve von **113**

Abbildung 10.24: FRET-Kurve von **112**Abbildung 10.25: FRET-Kurve von **108**

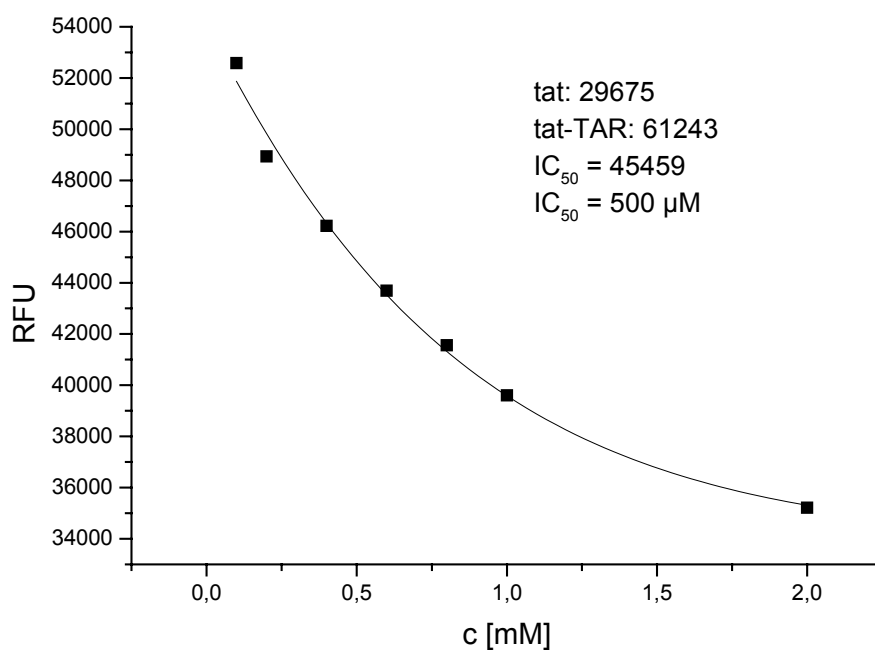


Abbildung 10.26: FRET-Kurve von Acetylpromazin 43

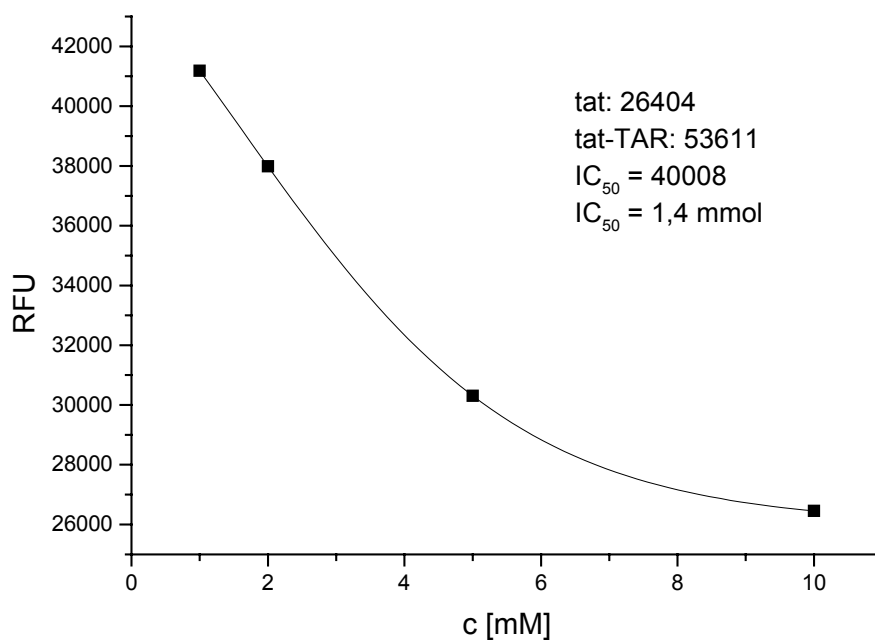


Abbildung 10.27: FRET-Kurve von Argininamid 34

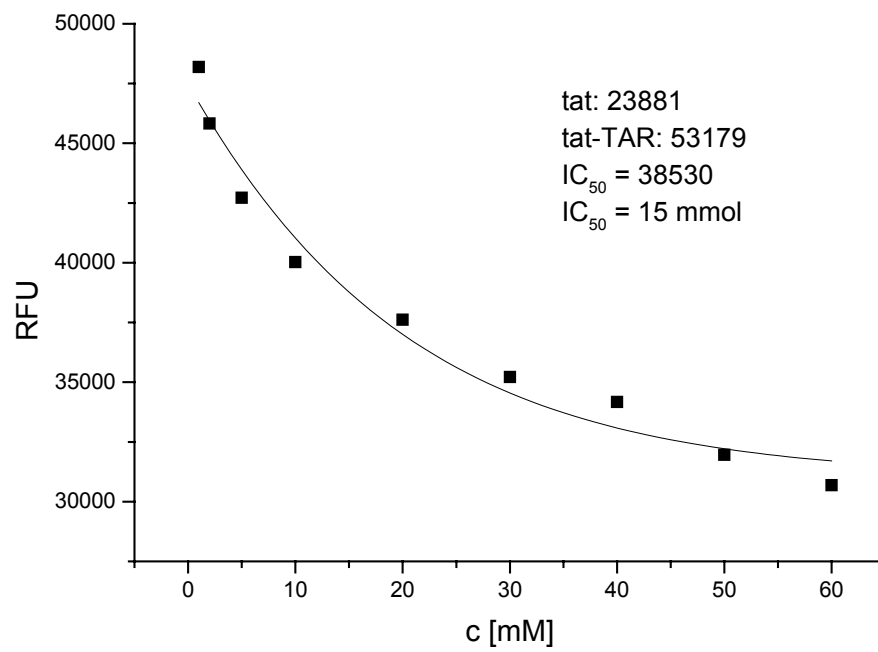


Abbildung 10.28: FRET-Kurve von Diaminotriazol 116

11 Literaturverzeichnis

- ¹ a) W. Winkler, A. Nahvi, R.R. Breaker, *Nature*, **2002**, 419, 952-956; b) A. Nahvi, N. Sudarsan, M.S. Ebert, X. Zou, K.L. Brown, R.R. Breaker, *Chem. Biol.*, **2002**, 9, 1043-1049.
- ² A. Schatz, E. Bugie, S.A. Waksman, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1944**, 55, 66-69.
- ³ M. R. Barbachyn, C. W. Ford, *Angew. Chem.*, **2003**, 115, 2056-2070.
- ⁴ http://www.unaids.org/bangkok2004/GAR2004_html/ExecSummary_en/Execsumm_en.pdf.
- ⁵ C. Dingwall, I. Ernberg, M. J. Gait, S. M. Green, S. Heaphy, J. Karn, A. D. Lowe, M. Singh, M. A. Skinner, R. Valerio, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1989**, 86, 6925-6929.
- ⁶ L. Lund, B. Wahren, M. A. Garcia-Blanco, *J. Gen. Virol.*, **2003**, 84, 603-606.
- ⁷ (a) J. D. Puglisi, R. Tan, B. J. Calnan, A. D. Frankel, J. R. Williamson, *Science*, **1992**, 257, 76-81; (b) D. Puglisi, L. Chen, A. D. Frankel, J. R. Williamson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90, 3680-3684.
- ⁸ (a) F. Aboul-ela, J. Karn, G. Varani, *J. Mol. Biol.*, **1995**, 253, 313-323; (b) R. Nifosi, C. M. Reyes, P. A. Kollman, *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28, 4944-4955.
- ⁹ Y. Tor, *ChemBioChem*, **2003**, 4, 998-1007.
- ¹⁰ B. G. Turner, M. F. Summers, *J. Mol. Biol.*, **1999**, 285 (1), 1880-1884.
- ¹¹ N. W. Luedtke, Y. Tor in *DNA and RNA Binders* (Editor: M. Demeunynck, C. Bailly, W. D. Wilson), Wiley-VCH, Weinheim, **2003**, 18-40.
- ¹² K. Vermeire, Y. Zhang, K. Princen, S. Hatse, M. F. Samala, *Virology*, **2002**, 302, 342-353.
- ¹³ K. Vermeire, T. W. Bell, H.-J. Choi, Q. Jin, S. M. Samala, A. Sodoma, E. De Clercq, D. Schols, *Mol. Pharmacol.*, **2003**, 63, 203-210.
- ¹⁴ K. Vermeire, K. Princen, S. Hatse, E. De Clercq, K. Dey, T. W. Bell, D. Schols, *AIDS*, **2004**, 18, 2115-2125.
- ¹⁵ M. R. Boyd, K. R. Gustafson, J. B. McMahon, R. H. Shoemaker, B. R. O'Keefe, T. Mori, R. J. Gulakowski, L. Wu, M. I. Rivera, C. M. Laurencot, M. J. Currens, J. H. Cardellina, R. W. Buckheit, P. L. Nara, L. K. Pannell, R. C. Sowder, L. E. Henderson, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **1997**, 45, 1521-1530.
- ¹⁶ T. Mori, M. R. Boyd, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **2001**, 45, 664-672.
- ¹⁷ T. Wang, Z. Zhang, O. B. Wallace, M. Deshpande, H. Fang, Z. Yang, L. M. Zadjura, D. L. Tweedie, S. Huang, F. Zhao, S. Ranadive, B. S. Robinson, Y.-F. Gong, K. Ricarri, T. P. Spicer,

C. Deminie, R. Rose, H.-G. H. Wang, W. S. Blair, P.-Y. Shi, P.-F. Lin, *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 4236-4239.

¹⁸ E. De Clercq, *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2003**, *2*, 581-587.

¹⁹ M. Baba, O. Nishimura, N. Kanzaki, M. Okamoto, H. Sawada, Y. Iizawa, M. Shiraishi, Y. Aramaki, K. Okonogi, Y. Ogawa, K. Meguro, M. Fujiono, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1999**, *96*, 5698-5703.

²⁰ J. M. Stritzki, S. Xu, N. E. Wagner, L. Wojcik, J. Liu, Y. Hou, M. Endres, A. Palani, S. Shapiro, J. W. Clader, W. J. Greenlee, J. R. Tagat, S. McCombie, K. Cox, A. B. Fawzi, C.-C. Chou, C. Pugliese-Sivo, L. Davies, M. E. Moreno, D. D. Ho, A. Trokla, C. A. Stoddart, J. P. Moore, G. R. Reyes, B. M. Baroudy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2001**, *98*, 12718-12723.

²¹ F. Tsamis, S. Grailov, F. Kajumo, C. Seibert, S. Kuhmann, T. Ketas, A. Trkola, A. Palani, J. W. Clader, J. R. Tagat, S. McCombie, B. Baroudy, J. P. Moore, T. P. Sakmar, T. Dragic, *J. Virol.*, **2003**, *77*, 5201-5208.

²² J. J. Hale, R. J. Budhu, E. B. Holson, P. E. Finke, B. Oates, S. G. Mills, M. McCoss, S. L. Gould, J. A. DeMartino, M. S. Springer, S. Siciliano, L. Malkowitz, W. A. Schleif, D. Hazuda, M. Miller, J. Kessler, R. Danzeisen, K. Holmes, K. Lineberger, A. Carella, G. Carver, E. Emini, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 2741-2745.

²³ J. M. Kilby, S. Hopkins, S. M. Venetta, B. DiMassimo, G. A. Gloud, J. Y. Lee, L. Alldredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M. R. Johnson, M. A. Nowak, G. M. Shaw, M. S. Saag, *Nat. Med.*, **2003**, *4*, 1302-1307.

²⁴ A. Lazzarin, B. Cloet, D. Copper, J. Reynes, K. Arasteh, M. Nelson, C. Katlama, H.-J. Stellbrink, J.-F. Delfraissy, J. Lange, L. Huson, R. DeMasi, C. Wat, J. Delehanty, C. Drobnes, M. Salgo, *N. Engl. J. Med.*, **2003**, *348*, 2186-2195.

²⁵ J. T. Ernst, O. Kutzki, A. K. Debnath, S. Jiang, H. Lu, A. D. Hamilton, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2002**, *41*, 278-281.

²⁶ E. DeClercq, *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.*, **2003**, *1*, 21-43.

²⁷ E. DeClercq, *Antiviral Res.*, **1998**, *38*, 153-179.

²⁸ J. Ren, C. Nichols, L. E. Bird, T. Fujiwara, H. Sugimoto, D. I. Stuart, D. K. Stammers, *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 14316-14320.

²⁹ R. Dayam, N. Neamati, *Curr. Pharm. Res.*, **2003**, *9*, 1798-1902.

³⁰ P. J. King, W. E. Robinson Jr., *J. Virol.*, **1998**, *72*, 8420-8424.

- ³¹ Y. Goldgur, R. Craigie, G. H. Cohen, T. Fujiwara, T. Yoshinaga, T. Fujishita, H. Sugimoto, T. Endo, H. Murai, D. R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1999**, 96, 13040-13043.
- ³² D. J. Hazuda, P. Felock, M. Witmer, A. Wolfe, K. Stillmock, J. A. Grobler, A. Espeseth, L. Gabryelski, W. Schleif, *Science*, **2000**, 287, 646-650.
- ³³ J. A. Grobler, K. Stillmock, B. Hu, M. Witmer, P. Felock, A. Espeseth, A. Wolfe, M. Egbertson, M. Bourgeois, J. Melamed, J. S. Wai, S. Young, J. Vacca, D. J. Hazuda, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2002**, 99, 6661-6666.
- ³⁴ Y. F. Gong, B. S. Robinson, R. E. Rose, C. Deminie, T. P. Spicer, D. Stock, R. J. Colonno, P. F. Lin, *Antimicro. Agents. Chemother.*, **2000**, 44, 2319-2326.
- ³⁵ D. J. Patel, L. Shapiro, D. Q. Hare, *Rev. Biophys.*, **1987**, 20, 78-86.
- ³⁶ A. Pardi, *Methods Enzymol.*, **1995**, 261, 350-380.
- ³⁷ H. W. Pley, K. M. Flaherty, D. B. McKay, *Nature*, **1994**, 327, 68-74.
- ³⁸ J. H. Cate, A. R. Gooding, E. Podell, *Science*, **1996**, 273, 1678-1685.
- ³⁹ C. S. Chow, F. M. Bogdan, *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 1489-1513.
- ⁴⁰ K. M. Weeks, D. M. Crothers, *Cell*, **1991**, 66, 577-588.
- ⁴¹ T. Hermann, E. Westhof, *J. Mol. Biol.*, **1998**, 276, 903-912.
- ⁴² L. Jiang, D. J. Patel, *Nat. Struct. Biol.*, **1998**, 5, 769-774.
- ⁴³ F. Hamy, V. Brondani, A. Florsheimer, W. Stark, M. J. Blommers, T. Klimkait, *Biochemistry*, **1998**, 37, 5086-5095.
- ⁴⁴ G. J. Quigley, M. M. Teeter, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1978**, 75, 64-68.
- ⁴⁵ T. Tao, J. H. Nelson, C. R. Cantor, *Biochemistry*, **1970**, 9, 2660-2665.
- ⁴⁶ M. Liebmann, J. Rubin, M. Sundaralingam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, 74, 4821-4823.
- ⁴⁷ T. Hermann, *Angewandte Chemie*, **1999**, 112, 1962-1979.
- ⁴⁸ G. R. Zimmermann, R. D. Jenison, C. L. Wick, J. P. Simorre, A. Pardi, *Nat. Struct. Biol.*, **1990**, 4, 644-649.
- ⁴⁹ S. Feng, E. C. Holland, *Nature*, **1988**, 334, 165-167.
- ⁵⁰ K. Yankulov, D. Bentley, *Curr. Biol.*, **1998**, 8, R447-R449.
- ⁵¹ B. J. Calman, B. Tidor, S. Biancalana, D. Hudson, A. D. Frankel, *Science*, **1991**, 252, 1167-1171.
- ⁵² J. D. Puglisi, R. Tan, B. J. Calnan, A. D. Frankel, J. R. Williamson, *Science*, **1992**, 257, 76-81.

- ⁵³ J. D. Puglisi, L. Chen, A. D. Frankel, J. R. Williamson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 3680-3684.
- ⁵⁴ F. Aboul-ela, J. Karn, G. Varani, *J. Mol. Biol.*, **1995**, *253*, 313-332.
- ⁵⁵ K. S. Long, D. M. Crothers, *Biochemistry*, **1999**, *38*, 10059-10069.
- ⁵⁶ R. Nifosi, C. M. Reyes, P. A. Kollman, *Nucleic Acids Res.*, **2000**, *28*, 4944-4955.
- ⁵⁷ A. S. Brodsky, J. R. Williamson, *J. Mol. Biol.*, **1997**, *267*, 624-639.
- ⁵⁸ W. D. Wilson, L. Ratmeyer, M. Zhao, L. Strekowski, D. Boykin, *Biochemistry*, **1993**, *32*, 4098-4104.
- ⁵⁹ (a) X.-S. Ye, L.-H. Zhang, *Curr. Med. Chem.*, **2002**, *9*, 929-939; (b) S. J. Sucheck, Y.-K. Shue, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.*, **2001**, *4*, 462-470; (c) K. Michael, Y. Tor, *Chem. Eur. J.*, **1998**, *4*, 2091-2098.
- ⁶⁰ H. Y. Mei, A. A. Galan, N. S. Halim, D. P. Mack, D. W. Moreland, K. B. Sanders, H. N. Truong, A. W. Czarnik, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1995**, *5*, 2755-2760.
- ⁶¹ (a) A. Litovchick, A. G. Evdokimov, A. Lapidot, *Biochemistry*, **2000**, *39*, 2838-2852; (b) A. Litovchick, A. G. Evdokimov, A. Lapidot, *FEBS Lett.*, **1999**, *445*, 73-79.
- ⁶² T. Hermann, E. Westhof, *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 1250-1261.
- ⁶³ H.-Y. Mei, D. P. Mack, A. A. Galan, N. S. Halim, A. Heldsinger, J. A. Loo, D. W. Moreland, K. A. Sannes-Lowery, L. Sharmeen, H. N. Truong, A. W. Czarnik, *Bioorg. Med. Chem.*, **1997**, *5*, 1173-1184.
- ⁶⁴ C. Faber, H. Sticht, K. Schweimer, P. Rösch, *J. Biol. Chem.*, **2000**, *27*, 20660-20666.
- ⁶⁵ (a) W. F. Michne, J. D. Schroeder, T. R. Bailey, *J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 2701-2702; (b) M.-C. Hsu, A. D. Schutt, M. Holly, L. W. Slice, M. I. Sherman, D. D. Richman, M. J. Potash, D. J. Volsky, *Science*, **1991**, *254*, 1799-1803.
- ⁶⁶ L. A. Cuppelli, M.-C. Hsu, *J. Virol.*, **1995**, *69*, 2640-2643.
- ⁶⁷ (a) C. Bailly, P. Colson, C. Houssier, F. Hamy, *Nucleic Acids Res.*, **1996**, *24*, 1460-1464; (b) L. Daßonneville, F. Hamy, P. Colson, C. Houssier, C. Bailly, *Nucleic Acids Res.*, **1997**, *25*, 4487-4492.
- ⁶⁸ H.-Y. Mei, D. P. Mack, A. A. Galan, N. S. Halim, A. Heldsinger, J. A. Loo, D. W. Moreland, K. A. Sannes-Lowery, L. Sharmeen, H. N. Truong, A. W. Czarnik, *Bioorg. Med. Chem.*, **1997**, *5*, 1173-1184.

- ⁶⁹ C. Mischiati, K.-T. Jeang, G. Feriotto, L. Breda, M. Borgatti, N. Bianchi, R. Gambari, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **2001**, 11, 209-217.
- ⁷⁰ Q. Chen, R. H. Shafer, I. D. Kuntz, *Biochemistry*, **1997**, 36, 11402-11407.
- ⁷¹ K. E. Lind, Z. Du, K. Fujinaga, B. M. Peterlin, T. L. James, *Chem. Biol.*, **2002**, 9, 185-193.
- ⁷² Mayer, M., James, T., L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 4453-4460.
- ⁷³ (a) Davis, B., Afshar, M., Varani, G., Murchie, A. I. H., Karn, J., Lentzen, G., Drysdale, M., Bower, J., Potter, A. J., Starkey, I. D., Swarbrick, T., Aboul-ela, F., *J. Mol. Biol.*, **2004**, 336, 343-356; (b) Murchie, A. I. H., Davis, B., Isel, C., Afshar, M., Drysdale, M. J., Bower, J., Potter, A. J., Starkey, I. D., Swarbrick, T. M., Mirza, S., Prescott, C. D., Vaglio, P., Aboul-ela, F., Karn, J., *J. mol. Biol.* **2004**, 336, 625-638.
- ⁷⁴ F. Hamy, E. R. Felder, G. Heizmann, J. Lazdins, F. Aboul-Ela, G. Varani, J. Karn, T. Klimkait, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1997**, 94, 3548-3553.
- ⁷⁵ I. Huq, Y. Ping, N. Tamilarasu, T. M. Rana, *Biochemistry*, **1999**, 38, 5172-5177; siehe auch: A. Garbesi, F. Hamy, M. Maffini, G. Albrecht, T. Klimkait, *Nucleic Acids Res.*, **1998**, 26, 2886-2890.
- ⁷⁶ (a) X. Wang, I. Huq, T. M. Rana, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 6444-6445; (b) N. Tamilarasu, I. Huq, T. M. Rana, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 1597-1598.
- ⁷⁷ V. Kesavan, N. Tamilarasu, H. Cao, T. M. Rana, *Bioconjugate Chem.*, **2002**, 13, 1171-1175.
- ⁷⁸ S. Hwang, N. Tamilarasu, K. Ryan, I. Huq, S. Richter, W. C. Still, T. M. Rana, *Proc. Natl. Aca. Sci. U.S.A.*, **1999**, 96, 12997-13002.
- ⁷⁹ N. Tamilarasu, I. Huq, T. M. Rana, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, 10, 971-974.
- ⁸⁰ S. Hwang, N. Tamilarasu, K. Kibler, H. Cao, A. Ali, Y.-H. Ping, K.-T. Jeang, T. M. Rana, *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278, 39092-39103.
- ⁸¹ M. H. Elnagdi, G. E. H. Elgemeie, F. A.-E. Abd-Elaal, *Heterocycles*, **1985**, 23, 3121.
- ⁸² H. Garia, S. Iborra, M. A. Mirando, I. M. Morera, J. Primo, *Heterocycles*, **1991**, 29, 1745.
- ⁸³ T. Nagai, M. Hamaguchi, *Organic Preperation and Procedures Int.* **1993**, 25, 403-411.
- ⁸⁴ O. Boden, *Diploma thesis*, Goethe Universität Frankfurt, **2000**
- ⁸⁵ E.C. Taylor, K.S. Hartke, *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, 81, 2452-2459.
- ⁸⁶ J.A. Settepani, J.B. Stokes, *J. Org. Chem.*, **1968**, 33, 2606-2606.
- ⁸⁷ S. A. Shevelev, I. L. Dalinger, *Russ. J. Org. Chem.*, **1998**, , 34, 1071-1080.

- ⁸⁸ M. D. Coburn, *J. Heterocycl. Chem.*, **1970**, 7, 707-712.
- ⁸⁹ D. E. Butler, H. A. DeWald, *J. Org. Chem.*, **1975**, 40, 1353-1355.
- ⁹⁰ P. F. Pagoria, A. R. Mitchell, R. D. Schmidt, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 2934-2935.
- ⁹¹ G. Jander, E. Blasius, *Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie*, 13. Auflage, S. Hirzel Verlag, Stuttgart, **1989**, 223.
- ⁹² (a) H. Hinsberg, S. Garfunkel, *Liebigs Ann. Chem.*, **1896**, 292, 266-275.; (b) B. Ries, *Chem. Ber.*, **1886**, 19, 2206-2209.
- ⁹³ Die Messung wurde freundlicherweise von Dr. Scheibitz, Institut für anorganische Chemie, in Frankfurt durchgeführt.
- ⁹⁴ G. Seifert, Dissertation, Frankfurt am Main, in Vorbereitung
- ⁹⁵ (a) K. E. Lind, Z. Du, K. Fujianaga, B. M. Peterlin, T. L. James, *Chemistry and Biology*, **2002**, 9, 185-193 ; (b) Z. Du, K. E. Lind, T. L. James, *Chemistry and Biology*, **2002**, 9, 707-712.
- ⁹⁶ Furka, A., notarierte Dokumentnummer 36237/1982, Dr. J. Bokai, State NoTARy Public, 15. Juni, 1982, Budapest.
- ⁹⁷ Á. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibo, *Abstr. 14th Int. Congr. Biochem. Prague, Czechoslovakia 1988*, 5, 47.
- ⁹⁸ Houghten, R. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 5131-5135.
- ⁹⁹ Furka, A., Sebestyén, F., Asgedom, M., Dibó G., *Int. J., Peptide Protein Res.*, **1991**, 37, 487-493.
- ¹⁰⁰ Lam, S. K., Salmon, S. E., Hersh, E. M., Hruby, V. J., Kazmierski, W. M., Knapp, R. J., *Nature* **1991**, 354, 82-84.
- ¹⁰¹ R. A. Houghten, C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, J. H. Cuervo, *Nature*, **1991**, 354, 84-86.
- ¹⁰² P. Wang, G. Arabaci, D. Pei, *J. Comb. Chem.* **2001**, 3, 251-254.
- ¹⁰³ C. L. Brummel, I. N. W. Lee, Y. Zhou, S. J. Benkovic, N. Winograd, *Science* **1994**, 264, 399-402.
- ¹⁰⁴ S. Hwang, N. Tamilarasu, K. Ryan, I. Huq, S. Richter, W. C. Still, T. M. Rana, *Proc. Natl. Aca. Sci. USA* **1999**, 96, 12997-13002.
- ¹⁰⁵ N. K. Terrett, *Kombinatorischen Chemie*, **2000**, Springer-Verlag.
- ¹⁰⁶ A. Borchardt, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, 89, 5381-5383.

- ¹⁰⁷ (a) Z.-J. Ni, D. Maclean, C. P. Holmes, M. M. Murphy, B. Ruhland, J. W. Jacobs, E. M. Gordon, M. A. Gallop, *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 1601-1608; (b) D. Mclean, J. R. Schullek, M. M. Murphy, Z.-J. Ni, E. M. Gordon, M. A. Gallop, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1997**, 94, 2805-2810.
- ¹⁰⁸ (a) K. C. Nicolaou, X.-Y. Xiao, Z. Parandoosh, A. Senyei, M. P. Nova, *Angew. Chem.*, **1995**, 107, 2289-2291; (b) E. J. Moran, S. Sarshar, J. F. Cargill, M. M. Shahbaz, A. Lio, A. M. M. Mjalli, R. W. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 10787-10788.
- ¹⁰⁹ (a) M. H. J. Ohlmeyer, R. N. Swanson, L. W. Dillard, J. C. Reader, G. Asouline, R. Kobayashi, M. Wigler, W. C. Still, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1993**, 90, 10922-10926; (b) W. C. Still, *Acc. Chem. Res.*, **1996**, 29, 155-163.
- ¹¹⁰ A. Borchard, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 373-374.
- ¹¹¹ S. Hwang, N. Tamilarasu, K. Kibler, H. Cao, A. Ali, Y.-H. Ping, K.-T. Jeang, T. M. Rana, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 39092-39103.
- ¹¹² M. Heinel, *Dissertation*, Frankfurt am Main, **2003**
- ¹¹³ Durchgeführt von Dipl. Chem. J. Graf, Arbeitsgruppe Prof. Schwalbe, Universität Frankfurt am Main
- ¹¹⁴ H. Haken, H. C. Wolf, *Molekülphysik und Quantenchemie*, 4. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, **2002**.
- ¹¹⁵ D. Klostermeier, D. P. Millar, *Methods*, **2001**, 23, 240-254.
- ¹¹⁶ C. Matsumoto, K. Hamasaki, H. Mihira, A. Ueno, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, 10, 1857-1861.
- ¹¹⁷ V. Ludwig, *Dissertation*, Frankfurt am Main, **2005**.
- ¹¹⁸ (a) V. Ludwig, *Dissertation*, Universität Frankfurt am Main, **2005**; (b) A. Krebs, *Dissertation*, Universität Frankfurt am Main, **2004**.
- ¹¹⁹ Zur Verfügung gestellt von Dr. M. Hennig, Scripps Research Institute, Ca, USA.
- ¹²⁰ Brodsky, A. S., Williamson, J. R., *J. Mol. Biol.* **1997**, 267, 624-639.
- ¹²¹ C.-F. Kröger, P. Selditz, M. Mutscher, *Z. Chem.*, **1965**, 5, 381-382.
- ¹²² Die Messungen wurden von Infraseriv Knapsack durchgeführt und unterliegen der Qualitätssicherung nach DIN EN ISO 9001 und DIN EN ISO/IEC 17025
- ¹²³ K. Kadir, G. Shaw, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1980**, 2728-2731.
- ¹²⁴ S. M. McElvain J. P. Schroeder, *J. Am. Chem. Soc.*, **1940**, 71, 40-47.

- ¹²⁵ J. A. Settepani, J. B. Stokes, *J. Org. Chem.*, **1968**, 33, 2606.
- ¹²⁶ J. P. H. Juffermans, C. L. Habraken, *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 4656-4660.
- ¹²⁷ M. Ehlert, K. Martin, S. Rettig, A. Stor, R. C. Thompson, J. Trotter, *Can. J. Chem.*, **1991**, 69, 432-439.
- ¹²⁸ E. Diez Barra, A. de la Hoz, A. Sanchez-Migallon, J. Tejada, *Synthetic. Comm.*, **1990**, 20, 2849-2853.
- ¹²⁹ S. Bergtrup, *Acta Chem. Scand.*, **1970**, 24, 1819-1829.
- ¹³⁰ J. Coburn, *J. Heterocycl. Chem.*, **1971**, 8, 153-155.
- ¹³¹ J. W. A. M. Janssen, C. L. Habraken, *J. Org. Chem.*, **1971**, 36, 3081-3083.
- ¹³² J. W. A. M. Janssen, H. J. Koeners, C. G. Kruse, C. L. Habraken, *J. Org. Chem.*, **1973**, 38, 1777-1782.
- ¹³³ P. F. Pagoria, A. R. Mitchell, R. D. Schmidt, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 2934-2935.
- ¹³⁴ R. D. Schmidt, G. S. Lee, P. F. Pagoria, A. R. Mitchell, R. Gilardi, *J. Heterocycl. Chem.*, **2001**, 38, 1227-1230.
- ¹³⁵ D. Muller, I. Zeltser, G. Bitan, C. Gilon, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 411-416.
- ¹³⁶ J. M. Damagala, T. H. Haskell, *J. Org. Chem.*, **1981**, 46, 134-140.
- ¹³⁷ A. A. Nagel, D. R. Liston, S. Jung, M. Mahar, L. A. Vincent, *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 1084-1089.
- ¹³⁸ J. O. Schreck, C. K. Hancock, R. M. Hedges, *J. Org. Chem.*, **1965**, 30, 3505-3512.
- ¹³⁹ F. Borsche, K. Barthenheimer, *Liebigs Annalen*, **1942**, 553, 250-257.
- ¹⁴⁰ C. Bright, T. J. Brown, P. Cox, F. Halley, P. Lockey, I. M. McLay, U. Moore, B. Porter, R. J. Williams, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, 8, 771-774.
- ¹⁴¹ Mamedov et al., *Zh. Org. Khim.*, 39, **2003**, 141, CSD-Refcode IJIBAE
- ¹⁴² Durchgeföhrt von Frau Dr. Ute Scheffer, Universität Frankfurt am Main

12 Publikationen

Inhibition of HIV-1 by a designed small molecule ligand of the regulatory RNA element TAR; O. Boden, Gunther Seifert, M. W. Göbel, **2006**, in Vorbereitung.

Classification and prediction of Ligands inhibiting HIV-1 Tat/TAR RNA interaction using a self-organizing map (SOM); A. Givehchi, V. Ludwig, O. Boden, A. Krebs, U. Scheffer, M. W. Göbel, G. Schneider, **2006**, in Vorbereitung

Neamine dimers targeting the HIV-1 TAR-RNA; E. Riguet, J. Désiré, O. Boden, V. Ludwig, M. W. Göbel, C. Bailly, J.-L. Décout, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 4651-4655.

New inhibitors of the Tat-TAR RNA interaction found with a fuzzy pharmacophore model; S. Renner, V. Ludwig, O. Boden, U. Scheffer, M. W. Göbel, G. Schneider, *ChemBioChem*, **2005**, *6*, 1119-1125.

Synthetic α -Amino Acids as Building Blocks for Novel RNA Ligands; A. Krebs, O. Boden, V. Ludwig, M. W. Göbel, *Peptide Revolution: Genomics, Proteomics & Therapeutics*, (Hrsg.: M. Chorev & T. K. Sawyer), Proceedings of the Eighteenth American Peptide Symposium, American Peptide Society, Boston, **2004**, 229-230.

Targeting the HIV Trans-Activation Responsive Region - Approaches Towards RNA-Binding Drugs; A. Krebs, V. Ludwig, O. Boden, M. W. Göbel, *ChemBioChem*, **2003**, *4*, 972-978.

13 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Oliver Boden
Geburtsdatum	10. Dezember 1971
Anschrift	Rennbahnstrasse 12 60528 Frankfurt am Main
Familienstand	verheiratet

Schulausbildung

1978-1982	Grundschule in Frankfurt am Main
1982-1992	Carl-Schurz-Gymnasium in Frankfurt am Main Leistungskurse: Chemie und Biologie
Juni 1992	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

Juli 1992 – Oktober 1993	Ableistung des Zivildienstes beim Arbeiter-Samariter-Bund in Frankfurt am Main
--------------------------	--

Hochschulausbildung

Oktober 1993 – Juni 2000	Studium der Chemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Juni 1996	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
Juli 2000 – Februar 2001	Durchführung der Diplomarbeit unter Leitung von Prof. Dr. M. W. Göbel mit dem Titel „ <i>Synthese von Kupplungsfähigen 3,5-Diaminopyrazolen</i> “ an der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main
Februar 2001	Abschluss der Diplomchemiker Hauptprüfung

Promotion

März 2001 – März 2005	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für organische Chemie und chemisch Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. W. Göbel; Anfertigung der Doktorarbeit mit dem Titel, „ <i>Design und Synthese heterocyclischer Liganden für die TAR-RNA aus HIV-1</i> “
-----------------------	---

Eidesstattlich Versicherung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

(Oliver Boden)